



HAL
open science

Caractérisation des interactions biomoléculaires entre des ligands peptidiques immobilisés sur une surface et des récepteurs cellulaires

Ludivine Sandrin

► **To cite this version:**

Ludivine Sandrin. Caractérisation des interactions biomoléculaires entre des ligands peptidiques immobilisés sur une surface et des récepteurs cellulaires. Chimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00453636

HAL Id: tel-00453636

<https://theses.hal.science/tel-00453636>

Submitted on 5 Feb 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Sciences, Technologie, Santé

THESE

Présentée par

Ludivine SANDRIN

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Chimie Biologie

Caractérisation des interactions biomoléculaires entre des ligands peptidiques immobilisés sur une surface et des récepteurs cellulaires

Encadrement : Dr. Liliane Coche-Guérente et Dr. Didier Boturyn

Soutenue le 17 Décembre 2009, devant le jury composé de :

Dr. Oleg MELNYK	Rapporteur
Pr. Pierre SCHAAF	Rapporteur
Dr. Christophe DEMAILLE	Examineur
Pr. Pierre LABBE	Examineur
Dr. Liliane COCHE-GUERENTE	Examinatrice
Dr. Didier BOTURYN	Examineur

Thèse préparée au Département de Chimie Moléculaire (UMR 5250) au sein de l'équipe
Ingénierie et Interactions Biomoléculaires.

Trois années. Trois années enfin (ou déjà !) terminées, successions de bons moments et d'autres, plus difficiles, de galères et d'avancées, de remises en question, de belles rencontres professionnelles et personnelles. Une aventure avant tout personnelle, mais qui implique finalement tant de monde. Tout ce monde qui m'a soutenue, conseillée, aidée, encouragée pendant cette période, chacun à sa manière, je voudrais ici les remercier sincèrement. Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans vous.

Pour avoir accepté de financer mes recherches, pour m'avoir intégrée dans son équipe, je remercie le Professeur Pascal Dumy.

Pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail, pour l'avoir enrichie par leurs remarques exigeantes et leurs conseils bienveillants, je remercie le Docteur Oleg Melnyk, de l'Institut de Biologie de Lille, le Professeur Pierre Schaaf, de l'Institut Charles Sadron de Strasbourg et le Docteur Christophe Demaille du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire de Paris VII.

Pour avoir présidé le jury, pour m'avoir accueillie au laboratoire, pour ses conseils avisés, je remercie le Professeur Pierre Labbé (Alors, ça marche ?).

Pour leur présence chaleureuse à mes côtés, leur encadrement remarquable, leur soutien, pour nos nombreuses discussions scientifiques (ou un peu moins), pour m'avoir supportée (dans les deux sens du terme) pendant trois ans, je remercie mes « chefs » Liliane Guérente et Didier Boturyn. Liliane, merci de m'avoir fait découvrir les joies de l'électrochimie et celles des montagnes grenobloises, merci de tes précieux conseils, de ton accompagnement au laboratoire, de ta disponibilité quotidienne (y compris le week-end !), merci pour tout. Didier, merci pour tes conseils efficaces en synthèse et pour tes blagues sur les blondes, pour ta découverte du monde de la physico-chimie en même temps que moi et pour ta confiance en mon travail.

Pour m'avoir fourni des cellules et un coin de paille pour les cultiver, je remercie le Docteur Jean-Luc Coll, de l'Institut Albert Bonniot de Grenoble. Je remercie également Dominique, Carole, Corine et Laetitia pour m'avoir initiée avec patience et compétence à la culture cellulaire.

Pour leur présence au quotidien au laboratoire, au détour d'une paille, d'un couloir ou à la cafétéria, pour leur conseils ou leur aide ponctuelle (mais non négligeable !) je remercie tous les membres du laboratoire de l'équipe I2BM et ceux du troisième étage du bâtiment B. Régine, Véronique, Marie-Thérèse et Sylvie P., merci pour votre aide, sans vous les tracasseries administratives auraient été beaucoup moins drôles !

Pour la colocation du bureau des thésards, pour leur bonne humeur quotidienne, pour nos soirées à peine arrosées, je remercie les « jeunes » du laboratoire, thésards : Marie (ma binôme maman, toujours prête pour un fou-rire), Jean (qui m'a transmis son flegmatisme et les pauses thé), Aurélien (grand Ienien irremplaçable), Xavier (mon binôme de thèse, compagnon de galère), Mathilde, Vincent, Walid, Nabil, Stéphanie, Myriam, Pierre (toujours percutant mais si sympathique, immense merci pour ton aide), Marie-Laure, Julien, Mathieu (mille mercis pour les dernières molécules !), Hajra (bon courage pour la fin...), Raoudha (je passe te voir un de ces jours en Tunisie), Corinne, Isabelle, Jessica, Adriana, Xu, Phaenicia (ce fut un plaisir de t'encadrer), Fabien (Merci, merci, merci, pour ton amitié, pour ta gentillesse, pour ton accueil et pour tout le reste), Sébastien et puis les nouveaux, Thibaut et Marc ; ou non-étudiants : Amandine (mille mercis pour ton aide en synthèse), Sumana, Ludo (un immense merci pour l'aide et le soutien au labo), Laura (mi amiga Argentina, soy muy feliz de tener una amiga como vos), Vicky (mi otra amiga Argentina), Camille P. (contente d'avoir partagé ta chambre aux journées du labo !), Lokesh, Galina, Isabel, Neus, Marcello (tac tac). Merci à tous pour votre amitié et le temps passé ensemble.

Pour leur soutien et leur échappatoire au quotidien, particulièrement pendant la rédaction, je remercie sincèrement Elena et la Plastie team. Merci à Klo d'avoir été un témoin de l'aboutissement de ce travail. Elena, si tu savais comme tes quelques mots publiés m'ont touchée...

Pour leur amitié, leur présence, leur façon de me faire voir la vie autrement, je remercie tous mes amis rencontrés à Paris, à Montpellier, en colo ou ailleurs. Merci Camille B. et Olivia d'être là.

Pour m'avoir conduite là où je suis aujourd'hui, pour n'avoir pas toujours compris ce que je faisais mais pour m'avoir toujours encouragée, pour m'avoir aidée dans mon cheminement, je remercie tous mes parents et grands-parents, les vrais et les « beaux » : Maman, Papa, Dom, Tuti, Hugues, Odile, Mamie Moune, Papom, Mamie Guite, Papy Jean, Mamie Colette et Popi.

Pour être toujours là, je remercie ma famille et ma belle-famille. Il paraît qu'on est un peu compliqué, mais l'essentiel, c'est de s'y retrouver !

Pour son soutien, sa présence, ses encouragements, sa compréhension, son écoute, ses allers-retours en train, son amour et pour tout le reste, je remercie Bertrand. Je te dédie cette thèse mon amour...

Je me représente la vaste enceinte des sciences, comme un grand terrain parsemé de places obscures et de places éclairées. Nos travaux doivent avoir pour but, ou d'étendre les limites des places éclairées, ou de multiplier sur le terrain les centres de lumière. L'un appartient au génie qui crée, l'autre à la sagacité qui perfectionne. Nous avons trois moyens principaux : l'observation de la nature, la réflexion et l'expérience. L'observation recueille les faits, la réflexion les combine, l'expérience vérifie le résultat de la combinaison. Il faut que l'observation de la nature soit assidue, que la réflexion soit profonde, et que l'expérience soit exacte.

Denis Diderot

L'homme raisonnable s'adapte au monde ; l'homme déraisonnable s'obstine à essayer d'adapter le monde à lui-même. Tout progrès dépend donc de l'homme déraisonnable.

George Bernard Shaw

Table des matières

Glossaire.....	13
Introduction.....	17
Chapitre I : Bibliographie.....	21
I. Les interactions biomoléculaires.....	21
1. Généralités.....	21
2. Les interactions ligand peptidique/récepteur cellulaire : exemple de l'interaction RGD/Intégrine $\alpha_v\beta_3$	24
II. Caractérisation physico-chimique des interactions biomoléculaires.....	27
1. Introduction.....	27
2. Les différentes méthodes de biofonctionnalisation de surface.....	29
3. Les différentes méthodes de caractérisation des interactions à l'interface solide/liquide - Application à l'adhésion cellulaire.....	45
III. Présentation des travaux de thèse.....	57
1. Travaux préliminaires.....	57
2. Projet de recherche.....	61
Chapitre II : Synthèse des macromolécules peptidiques.....	67
I. Introduction.....	67
1. La liaison éther d'oxime.....	67
2. La synthèse peptidique sur support solide.....	68
3. Plan de synthèse.....	69
II. Synthèse des cyclopentapeptides présentant le motif -RGD- et de l'analogue -RβAD-70	
1. Synthèse du dipeptide Lys-Ser, précurseur de la fonction aldéhyde.....	71
2. Synthèse des cyclopentapeptides.....	72
III. Synthèse des cyclodécapeptides biotinylés sur la face inférieure.....	73
1. Synthèse du châssis cyclodécapeptidique par la voie classique.....	73
2. Couplage de la biotine et des peptides RXD sur le cyclodécapeptide.....	74
IV. Synthèse du cyclodécapeptide lipidique permettant l'ancrage dans une bicouche.....	76
1. Synthèse de la lysine substituée par l'acide palmitoïque.....	76
2. Synthèse de la lysine substituée par une oxyamine protégée par le groupement 1-éthoxyéthylidène.....	76
3. Synthèse du cyclodécapeptide lipidique.....	77
V. Synthèse de cyclodécapeptides permettant un ancrage covalent sur les surfaces.....	79
1. Synthèse des molécules de reconnaissance présentant une fonction aldéhyde.....	79
2. Synthèse des molécules de reconnaissance présentant une fonction alcyne.....	81
VI. Conclusion du chapitre.....	82
Chapitre III : Caractérisations physico-chimiques des surfaces biofonctionnalisées et évaluation de leurs propriétés de reconnaissance par des tests d'adhésion cellulaire.....	87
I. Introduction.....	87
II. Couplage affin via le complexe streptavidine/biotine.....	88
1. Caractérisation de la couche biomoléculaire.....	90
2. Tests d'adhésion cellulaire.....	117
3. Conclusion.....	134
III. Adhésion cellulaire sur bicouche lipidique.....	134
1. Préparation des SUV.....	135
2. Formation de la bicouche.....	136
3. Tests d'adhésion cellulaire.....	140

4. Conclusion.....	148
IV. Couplage covalent.....	148
1. Couplage par formation d'un lien oxime	148
2. Couplage par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens.....	154
V. Comparaison des différentes techniques de couplage.....	162
Conclusion générale et perspectives	167
Partie expérimentale	171
I. Synthèse.....	171
1. Materials and Equipments.....	171
2. General Procedures for Syntheses of Peptides	171
II. Physico-chimie.....	186
1. Solvants et produits.....	186
2. Traitements de surfaces d'or	186
3. Electrochimie.....	186
4. Ellipsométrie	187
5. Mesure d'angles de contact	187
6. AFM.....	187
7. Autres méthodes.....	187
8. Culture cellulaire.....	187
9. QCM-D.....	188
10. Microscopie.....	192
Références bibliographiques	197

Glossaire

AcOH	Acide acétique
AFM	Microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy)
Alloc	Allyloxy-carbonyle
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxy-carbonyle
BSA	Bovin Serum Albumin
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCU	dicyclohexylurée
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSI	Desorption Chemical Ionization
Eei	éthoxyéthylidène
eq.	Equivalent molaire
ESI	Electronspray Ionisation
Fmoc	9-fluorénylméthoxy-carbonyl
HEK(293)	Lignée de cellules épithéliales de rein embryonnaire humain
MeOH	Méthanol
NHS	N-hydroxysuccinimide
OEG	Oligo(éthylène glycol)
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Poly(éthylène glycol)
Pmc	2,2,5,7,8-pentaméthylchromane-8-sulfonyl
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
QCM-D	Microbalance à cristal de quartz avec suivi de la dissipation d'énergie (Quartz Cristal Microbalance with Dissipation monitoring)
r.t.	room temperature
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	Reverse Phase - High-Performance Liquid Chromatography
rT	Temps de rétention
SAM	Monocouche auto-assemblée (Self Assembled Monolayer)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPPS	Synthèse peptidique sur support solide (Solid Phase Peptide Synthesis)
SPR	Résonance plasmonique de surface (Surface Plasmon Resonance)
SUV	Vésicule de petite taille (Small Unilamellar Vesicle)
t.a.	Température ambiante
<i>t</i>Bu	<i>Tertio</i> -butyl
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	Acide trifluoroéthanoïque
TIS	Triisopropylsilane
Tris	Tris[hydroxyméthyl]aminométhane hydrochloride

Introduction

Introduction

La communication cellulaire est un phénomène essentiel et indispensable à tous les organismes vivants. Les processus de reconnaissance s'établissent entre les cellules et leur environnement grâce à deux acteurs principaux, un récepteur et un ligand, *via* des interactions spécifiques plus ou moins fortes. Les récepteurs et les ligands impliqués dans les interactions sont de natures diverses : protéines, oligosaccharides, peptides, petites molécules organiques. Les récepteurs cellulaires reçoivent les informations de l'environnement extracellulaire et les transforment en signaux intracellulaires. Les dérèglements possibles des voies de communications créent, le plus souvent, des pathologies. On comprend alors aisément que l'étude et la compréhension des interactions biomoléculaires est un enjeu thérapeutique important. Les applications envisageables sont nombreuses particulièrement dans le domaine diagnostique, de la mise au point de nouvelles thérapies ou de nouveaux matériaux biocompatibles. L'élaboration de surfaces biomimétiques résultant de l'immobilisation d'un des partenaires biologiques sur une surface constitue une méthodologie de travail largement appliquée aujourd'hui à l'étude des interactions biomoléculaires. Le processus de reconnaissance est ainsi confiné dans deux dimensions ce qui optimise la détection de l'interaction. Cela permet également d'utiliser des techniques physico-chimiques de caractérisation de surface et d'approfondir ainsi notre connaissance des interactions moléculaires en biologie.

Le laboratoire « Ingénierie et Interactions Biomoléculaire » développe une recherche basée sur la conception et la synthèse de nouveaux motifs de reconnaissance moléculaire avec l'objectif final de mettre au point de nouvelles technologies dans le domaine des sciences de la vie et de la santé. Nous avons ainsi développé une expertise forte en synthèse de biomolécules et bioconjugués. Dans une seconde étape les propriétés de ces systèmes sont caractérisées par diverses méthodes physico-chimiques tandis que des collaborations avec des biologistes et des médecins permettent d'apporter la preuve du concept. Cette approche pluridisciplinaire a pour objectif de rationaliser et d'optimiser de manière interactive, la conception et le design de systèmes biomoléculaires en vue d'applications diagnostiques et thérapeutiques. Le laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années au processus de la néo-angiogenèse tumorale, ce processus pouvant ouvrir de nouvelles voies pour le diagnostic

précoce ou le traitement thérapeutique de tumeurs cancéreuses. Parmi les différentes possibilités de ciblage de la néo-angiogenèse tumorale, le laboratoire s'est intéressé à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette intégrine se lie de manière spécifique à la matrice extracellulaire via la séquence peptidique -arginine - glycine - acide aspartique- (-RGD-). Dans ce contexte, cette thèse a pour objectif l'étude physico-chimique des interactions entre des ligands peptidiques -RGD- et des cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Dans cette étude, les ligands sont portés par un châssis moléculaire cyclodécapeptidique et fixés à la surface de transducteurs physiques. La caractérisation des interactions est effectuée par des tests d'adhésion cellulaire.

L'immobilisation de biomolécules sur des surfaces impose quelques contraintes qu'il faut soigneusement prendre en compte pour optimiser les études d'interaction. Il est nécessaire, dans un premier temps, de limiter les interactions non spécifiques qui peuvent avoir lieu entre les surfaces fonctionnelles et l'analyte (protéines, cellules...). Ces interactions non spécifiques sont souvent irréversibles et entraînent des perturbations dans la détection des interactions spécifiques entre les biomolécules. De plus, l'immobilisation de la biomolécule ne doit pas modifier le site de liaison nécessaire à l'interaction qui doit rester disponible et correctement orienté pour se lier avec son partenaire. Enfin, la technique de détection mise en œuvre doit être adaptée à la spécificité de l'interaction engendrée. Ainsi, l'étude des interactions ligand peptidique/récepteur cellulaire exige des contraintes sur le choix de la méthode de détection liées à la taille des cellules et à la complexité du processus d'adhésion. Les choix de la méthode de fonctionnalisation de surface et de la technique de caractérisation des interactions seront largement discutés dans la suite de ce manuscrit.

La première partie de ce mémoire est consacrée à une étude bibliographique qui présente, d'une part les différentes méthodes d'immobilisation de biomolécules et plus particulièrement des ligands peptidiques et d'autre part les techniques physico-chimiques mises en œuvre pour l'étude de l'adhésion cellulaire sur des surfaces biospécifiques. Le second chapitre concerne les stratégies de synthèse des molécules utilisées au cours de ce travail. Enfin, le troisième chapitre est lui même divisé en trois parties qui présentent chacune les résultats obtenus pour les différents modes de greffage des ligands sur les surfaces. Pour chacune des trois approches mises en œuvre, la caractérisation des assemblages par des méthodes physico-chimiques est suivie de l'étude des interactions biomoléculaires réalisée par des tests d'adhésion cellulaire.

Chapitre I : Bibliographie

Chapitre I : Bibliographie

I. Les interactions biomoléculaires

1. Généralités

Les interactions moléculaires sont à la base de tous les systèmes vivants. Elles interviennent de façon fondamentale dans la plupart des processus vitaux comme le métabolisme, la réplication ou la croissance. Ces interactions impliquent un contact étroit et donc une complémentarité structurale entre deux molécules. Les deux partenaires impliqués dans cette reconnaissance moléculaire sont définis de la façon suivante :

- un récepteur

- une espèce reconnue par le récepteur. La nature de cette espèce peut être très variable et le terme général de ligand est le plus souvent employé pour désigner cette cible.

La reconnaissance moléculaire entre les deux entités résulte de leur complémentarité fonctionnelle, chimique et géométrique. L'image souvent utilisée pour illustrer cette complémentarité est le système « clé-serrure ».

Les interactions en biologie peuvent s'effectuer en solution comme dans le cas d'une enzyme soluble et son substrat mais elles opèrent le plus souvent aux interfaces comme dans le cas de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire ou dans les processus d'adhésion des virus et des bactéries aux cellules eucaryotes (Schéma 1).

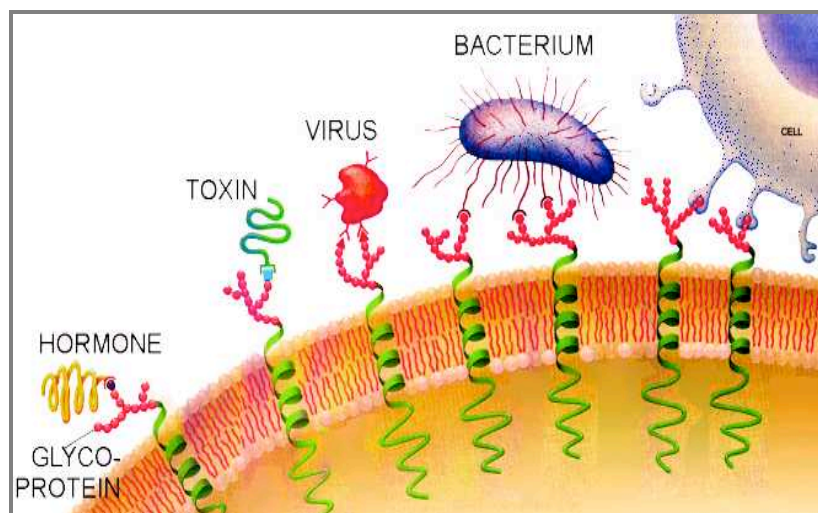


Schéma 1 : Différents partenaires impliqués dans les interactions biomoléculaires.

Afin d'avoir un rôle de régulation, les interactions mises en jeu sont plus ou moins fortes donc plus ou moins réversibles. Les forces qui interviennent dans la reconnaissance des biomolécules sont celles des liaisons non covalentes (Schéma 2).

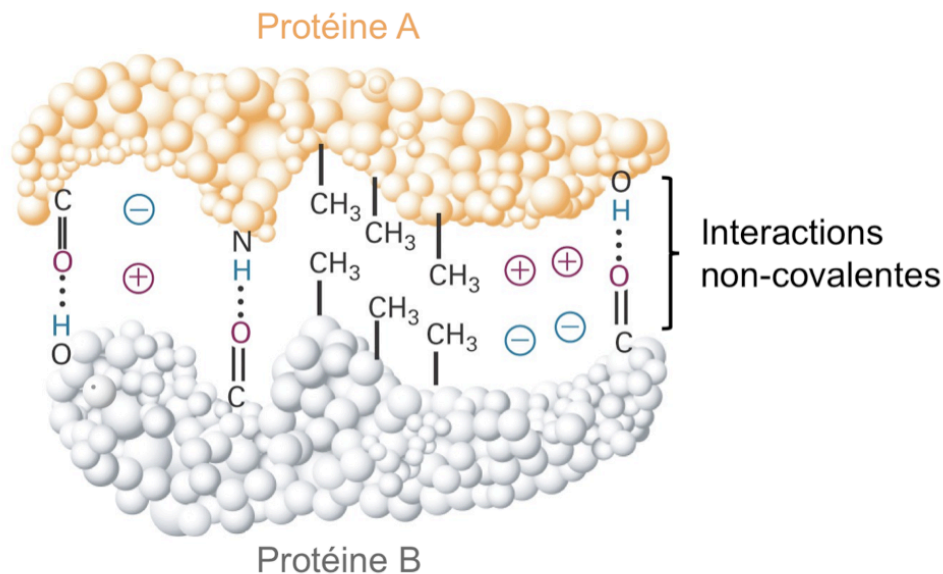


Schéma 2 : Illustration des différentes liaisons non covalentes (ionique, hydrogène ou hydrophobe) qui interviennent dans les interactions biomoléculaires.

Les liaisons ioniques entre groupements de charge opposée sont importantes. Par exemple, des liaisons ioniques se forment entre les groupements phosphate d'une molécule d'ADN et les charges positives des groupes ammonium de la surface d'une protéine afin de stabiliser le complexe. Les liaisons hydrogène se forment entre les groupements polaires des molécules biologiques, par exemple entre les deux brins d'une molécule d'ADN ou entre un oligosaccharide et une protéine. Les interactions hydrophobes, les forces de Van-der-Waals, les liaisons de coordination et les interactions cation- π sont également présentes pour stabiliser l'association de deux molécules biologiques. Prises individuellement, les interactions non-covalentes sont faibles, elles peuvent donc se rompre et se reformer facilement. Elles rendent ainsi dynamiques les interactions biomoléculaires. Mais c'est également la somme de ces liaisons faibles qui va stabiliser les interactions comme entre deux brins d'ADN ou entre différentes sous-unités d'une protéine.

Suite à l'interaction entre ligand et récepteur, de multiples évènements sont possibles suivant le contexte biologique et suivant la nature de cette interaction. De façon très générale, une interaction sert à envoyer un signal afin de provoquer un évènement ou une cascade d'évènements : internalisation, réplication, division cellulaire, mouvement, apoptose...

Selon la nature des partenaires mis en jeu, les interactions peuvent être dues à un seul ou plusieurs contacts (Schéma 3).

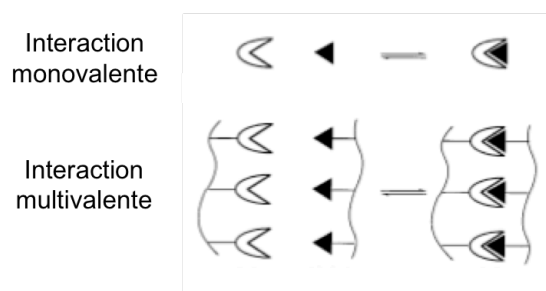


Schéma 3 : Schématisation des interactions monovalente et multivalente. Le récepteur est en blanc et le ligand en noir.

En effet, la stabilité du complexe ligand/récepteur peut-être renforcée par une interaction multivalente qui correspond à la liaison simultanée de plusieurs ligands à plusieurs sites récepteurs. La multivalence permet de renforcer la liaison entre les deux partenaires mais également de faire varier la réponse biologique par rapport à une liaison unique^{1,2}. Un exemple type d'interaction multivalente a lieu par exemple entre une surface présentant plusieurs exemplaires d'un même ligand comme c'est le cas pour la matrice extracellulaire et les récepteurs transmembranaires d'une cellule.

Au-delà de la complémentarité ligand/récepteur, les phénomènes coopératifs de multivalence nécessitent un arrangement spatial précis du récepteur, une présentation des ligands dans la bonne orientation et un espacement adéquat leur permettant de se lier de façon optimale au récepteur. Ainsi, les concepts de surface ont été adaptés pour mimer et étudier les interactions biomoléculaires mais également pour les appliquer à la conception de nouvelles méthodes dans le domaine des nanobiotechnologies. La compréhension de ces processus apparaît nécessaire à la connaissance de la chimie du vivant afin par exemple de mettre en évidence les propriétés de reconnaissance d'une nouvelle molécule d'intérêt ou de quantifier les interactions entre une molécule de reconnaissance et son partenaire biologique (études cinétiques et thermodynamiques). L'enjeu de l'étude des interactions est de les utiliser ensuite dans des applications technologiques et médicales comme l'élaboration de biomatériaux pour les implants, les méthodes diagnostiques de surface (biocapteurs, biopuces), le criblage de petites molécules, l'élaboration de surface pour la culture cellulaire ou la chromatographie d'affinité.

¹ Mammen, M. ; Choi, S.K. ; Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754-2774.

² Gestwicki, J.E. ; Cairo, C.W. ; Strong, L.E. ; Oetjen, K.A. ; Kiessling, L.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14922-14933.

Au sein de notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'interaction ligand peptidique/récepteur cellulaire et plus particulièrement à l'interaction entre le ligand peptidique -RGD- et une protéine transmembranaire : l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

2. Les interactions ligand peptidique/récepteur cellulaire : exemple de l'interaction RGD/Intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est sur-exprimée au niveau des tumeurs cancéreuses lors de la néo-angiogenèse. La néo-angiogenèse tumorale correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins destinés à la vascularisation de la tumeur. L'angiogenèse étant indispensable à tous les stades de la progression des cancers, priver la tumeur de ses néo-vaisseaux revient à empêcher sa croissance et peut aussi limiter la formation de métastases. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a donc été désignée, depuis le tout début des années 70 comme une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement du cancer.³

Les intégrines constituent une famille de protéines transmembranaires présentes à la surface de presque tous les types de cellules des vertébrés. Elles sont composées de deux chaînes polypeptidiques, une chaîne α et une chaîne β réunies par des liaisons non-covalentes. Dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β ont été identifiées et peuvent s'assembler pour former une vingtaine de récepteurs hétérodimériques répartis de façon spécifique au sein de l'organisme. Chaque dimère s'insère alors dans la membrane avec un petit domaine intracellulaire et un grand domaine extracellulaire d'environ 100 nm². Les intégrines sont une famille de récepteurs cellulaires intervenant dans les interactions cellule/cellule, cellule/matrice extracellulaire et cellule/pathogène⁴. Elles jouent un rôle important dans l'attachement des cellules à leur environnement et en particulier au réseau de protéines de la matrice extracellulaire (vitronectine, fibronectine, collagène). Dans les processus cancéreux, des études ont montré une sur-expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'environnement direct des tumeurs. La liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la vitronectine se fait via la séquence d'acides aminés RGD (Arginine - Glycine - Acide Aspartique, Schéma 4).

³ Folkman, J. *N. Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-1186.

⁴ Luo, B.H. ; Springer, T.A. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, 18, 579-586.

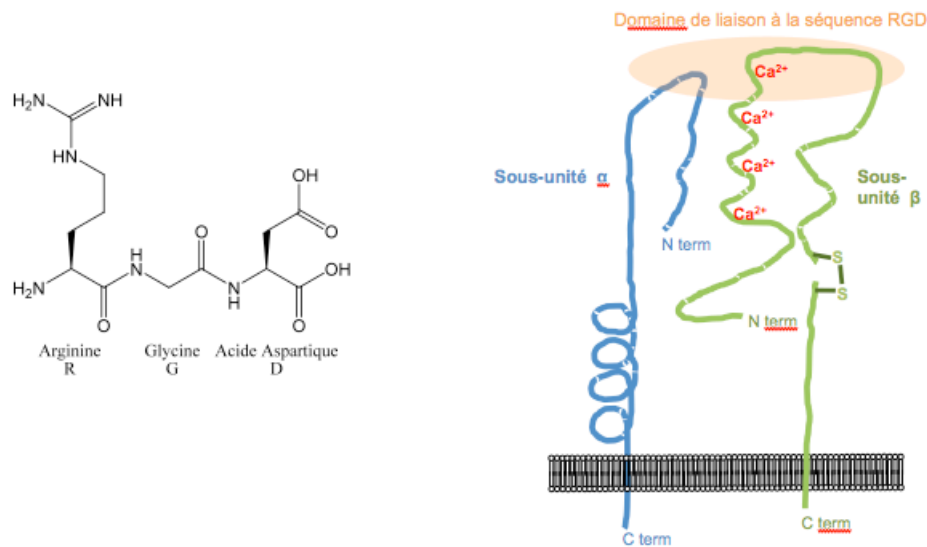


Schéma 4 : Formule développée du tripeptide RGD et schématisation des deux sous-unités de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le domaine de liaison au ligand.

Cette observation a favorisé le développement de nombreux systèmes présentant la séquence -RGD- qui est la séquence peptidique la plus souvent utilisée pour stimuler l'adhésion cellulaire sur des surfaces synthétiques. Toutefois, si la plupart des protéines de la matrice extracellulaire ont en commun le motif -RGD-, elles possèdent néanmoins des affinités variables pour les différentes intégrines. La spécificité d'une intégrine pour un substrat est attribuée à la conformation du motif -RGD- dans la protéine ainsi qu'à la nature des résidus adjacents. Les contraintes pour la mise au point d'un mime efficace sont nombreuses. Le Schéma 5 présente la structure cristalline d'un ligand cyclopentapeptidique présentant la séquence -RGD- dans le site actif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

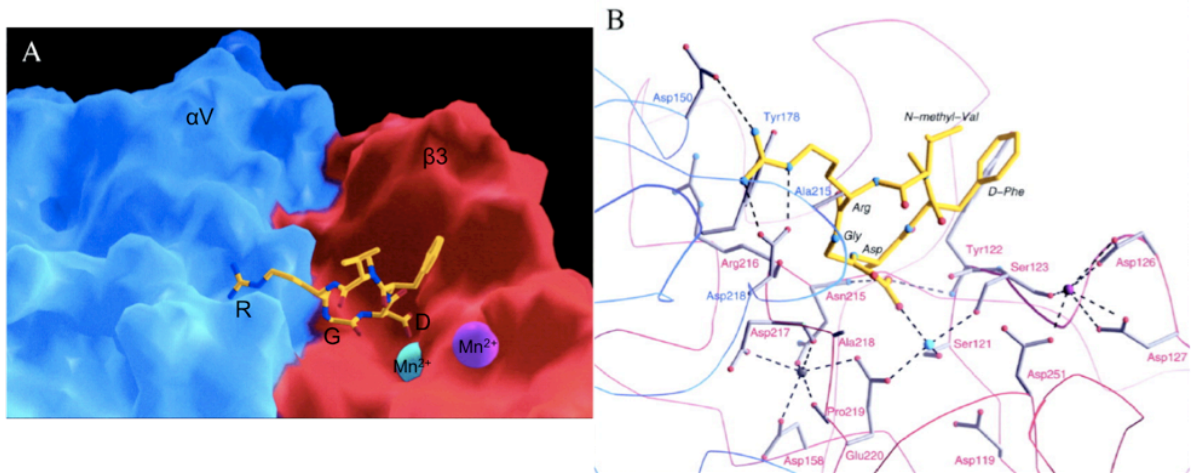


Schéma 5 : A) Structure cristalline d'un ligand c[RGDf(N-Me)V] (en jaune) dans le site de liaison à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. B) Interactions entre ligand c[RGDf(N-Me)V] et intégrine (même code couleur que A), sur le ligand, les atomes d'azote et d'oxygène sont respectivement en bleu et en rouge, les liaisons hydrogène et les ponts salins sont représentés en traits pointillés.⁵

On voit sur le Schéma 5 l'importance de l'organisation dans l'espace de chaque résidu et de l'espacement notamment entre les chaînes latérales de l'arginine et de l'acide glutamique.

Les premiers travaux, initiés par l'équipe de H. Kessler au début des années 90, ont porté sur l'incorporation de motif -RGD- au sein de séquence de penta et d'hexapeptides cycliques.^{6,7} Il a en effet été démontré que les peptides cycliques présentaient une affinité plus élevée vis-à-vis de la fixation des cellules que leurs analogues linéaires.^{7,8} La détermination des IC_{50} , en compétition avec la vitronectine, donne une affinité de 0,58 nM pour le peptide cyclique c[-RGDf(N-Me)V-] alors qu'elle est de l'ordre de 5 à 20 μ M pour les séquences linéaires.⁹ En comparaison, l'affinité d'une séquence similaire mais non reconnaissante (présentant un résidu β -alanine à la place du résidu glycine) est supérieure à 240 μ M.⁷

⁵ Xiong, J.P. ; Stehle, T. ; Zhang, R. ; Joachimiak, A. ; Frech, M. ; Goodman, S.L. ; Arnaout, M.A. *Science* **2002**, *296*, 151-155.

⁶ Aumailley, M. ; Gurrath, M. ; Müller, G. ; Calvete, J. ; Timpl, R. ; Kessler, H. *FEBS Letters*, **1991**, *1*, 50-54.

⁷ Gurrath, M. ; Müller, G. ; Kessler, H. ; Aumailley, M. ; Timpl, R. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-921.

⁸ Hersel, U ; Dahmen, C. ; Kessler, H. *Biomaterials*, **2003**, *24*, 4385-4415.

⁹ Goodman, S.L. ; Holzemann, G. ; Sulyok, G.A. ; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045-1051.

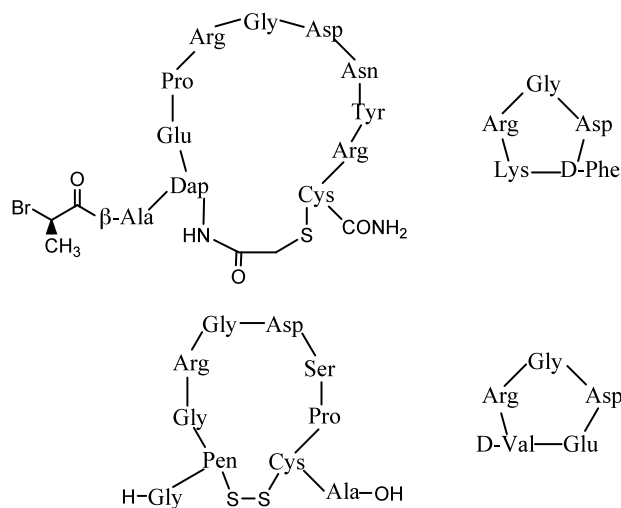


Schéma 6 : Peptides cycliques favorisant le processus d'adhésion cellulaire⁸.

La cyclisation permet de mimer au mieux la présentation des chaînes latérales et d'imposer une contrainte de mouvement, la liaison du fragment avec le site actif de l'intégrine est ainsi optimisée.

Une autre façon d'augmenter l'affinité des ligands pour l'intégrine est l'utilisation de la multivalence. En effet il a été montré que la présentation de plusieurs copies d'un même ligand -RGD- permettait d'augmenter la force d'interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.²

II. Caractérisation physico-chimique des interactions biomoléculaires

1. Introduction

La caractérisation des interactions, protéines/protéines notamment, peut se faire classiquement en solution, par RMN, spectroscopie de fluorescence, spectroscopie de masse ou calorimétrie de titration isotherme¹⁰. Ces techniques présentent cependant des limitations qui ont conduit au développement de nouvelles techniques de caractérisation des interactions où l'un des partenaires est immobilisé sur une surface. L'utilisation d'un transducteur permet de générer un signal exploitable, d'immobiliser un échantillon et/ou de le confiner dans un espace à deux dimensions. Un des principaux avantages de l'étude aux interfaces est que la fonctionnalisation de la surface peut être contrôlée et quantifiée. La distance entre les ligands, leur densité de greffage et leur distribution spatiale peuvent être ajustées. Néanmoins, l'étude de la caractérisation des interactions à l'interface solide/liquide présente quelques contraintes. De nombreuses méthodes de fonctionnalisation de surface par des biomolécules ont été

¹⁰ Lakey, J.H. ; Raggett, E.M. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1998**, 8, 119-123.

reportées dans la littérature. Le choix de la procédure devra prendre en compte les contraintes suivantes :

- Le site de fixation et la chimie de couplage ne devront pas interférer avec le site actif de la biomolécule immobilisée.

- La biomolécule immobilisée ne devra pas être dénaturée ou inactivée au cours de son greffage sur la surface.

- La méthode d'immobilisation de la biomolécule doit garantir son accessibilité.

- Le lien formé lors de la fixation de la biomolécule devra rester stable, le couplage ne devra pas être détruit par réactions avec les espèces présentes dans l'environnement.

- La technique d'immobilisation devra permettre de recouvrir entièrement la surface du substrat de façon à limiter l'adsorption non spécifique de l'analyte (ADN, protéines, cellules...).

Ce dernier point met en exergue un problème fondamental pour le greffage de la molécule d'intérêt sur une surface solide. Les molécules biologiques comme les protéines ou encore les cellules vivantes s'adsorbent spontanément sur une surface solide. De nombreux travaux de recherche ont été initiés pour résoudre ce problème et ont permis de mettre au point des méthodes limitant les phénomènes d'adsorption non spécifique.

Afin de caractériser l'interaction biomoléculaire, le choix du transducteur permettant de transformer l'interaction chimique ou biologique en un signal physique interprétable est primordial. De nombreux phénomènes physiques peuvent être exploités comme par exemple les ondes acoustiques, l'optique, l'électrochimie, la capacité thermique ou le transfert de chaleur. La technique choisie orientera le choix du substrat sur lequel sera immobilisé le ligand et de la méthode de fonctionnalisation du transducteur. Le substrat pourra être un métal (Au, Ag, Cu...), un oxyde métallique (SiO₂, TiO₂...) ou encore du silicium, du carbone, du mica ou des matériaux polymères.

Après avoir détaillé différentes méthodes de biofonctionnalisation des surfaces par des ligands, nous décrirons les différentes méthodes de caractérisation des interactions biomoléculaires appliquées au cas particulier de l'adhésion cellulaire stimulée par des ligands peptidiques fixés à la surface d'un substrat. Les exemples donnés dans ce paragraphe seront principalement des tests d'adhésion cellulaire (avec des cellules qui expriment ou surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$) sur des ligands -RGD- immobilisés.

2. Les différentes méthodes de biofonctionnalisation de surface.

a. Adsorption et adhésion non spécifique.

Le contrôle de l'interaction des biomolécules et des cellules avec les surfaces est un problème crucial dans le domaine de la santé et des biotechnologies. En effet, quand un matériau synthétique est mis en contact avec un fluide biologique, les protéines contenues dans le milieu s'adsorbent spontanément sur la surface. A la suite de cette première étape, souvent réversible, les protéines vont se réarranger afin d'exposer, sur une surface hydrophobe, leurs zones hydrophobes vers la surface et leurs zones hydrophiles vers la solution. Les protéines sont alors dénaturées et irréversiblement adsorbées sur la surface. De même, quand des cellules sont en contact avec une surface solide, elles vont rapidement adhérer puis sécréter des protéines qui leur permettront de s'ancrer fortement sur la surface. Ces propriétés sont par exemple utilisées dans la culture cellulaire dans les boîtes de pétri. La suppression de l'adsorption non spécifique s'avère donc indispensable à l'analyse des interactions spécifiques intermoléculaires à l'interface solide/liquide. De nombreux travaux ont été réalisés sur ce sujet où des méthodes permettant de limiter l'adsorption non spécifique de biomolécules sont développées.

Les propriétés physiques et chimiques qui rendent les surfaces résistantes à l'adsorption non spécifique des biomolécules sont mal connues. G. Whitesides¹ a proposé les caractéristiques générales suivantes d'une surface inerte : hydrophile, accepteur de liaisons hydrogènes et électriquement neutre. Dans la suite de ce paragraphe, trois méthodes qui permettent de limiter l'adsorption non spécifique des protéines et l'adhésion non spécifique des cellules sont présentées ; elles concernent le recouvrement des surfaces par l'albumine, les polymères d'éthylène glycol et la phosphorylcholine.

Les biologistes, les premiers, ont remédié au problème des interactions non spécifiques en utilisant des protéines inertes, comme l'albumine ou la caséine, qui peuvent être physisorbées sur la surface après greffage de l'un des partenaires biologiques sur la surface. En se dénaturant, elles agissent alors comme agent bloquant créant ainsi un tapis de polypeptides n'interagissant pas (ou peu) avec des protéines d'intérêt ou des cellules. Ce système est souvent utilisé pour bloquer les sites non fonctionnalisés sur une surface¹¹. Cependant cette approche a ses limitations puisqu'elle ne permet pas toujours d'éviter les interactions non spécifiques de type protéine-protéine.

¹¹ Liu, L. ; Chen, S. ; Giachelli, C.M. ; Ratner, B.D. ; Jiang, S. *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, 74A, 23-31.

Plusieurs classes de polymères¹², comme les polyacrylates, les oligosaccharides et les poly(éthylène glycol) (PEG), ont été explorées afin de rendre les surfaces inertes vis-à-vis de l'adsorption des biomolécules. Dès la fin des années 80 en effet, il a été montré que les groupements PEG ($[-O-CH_2-CH_2-]_n$) permettait de résister à l'adsorption non spécifique des protéines¹³. Les groupements PEG ou OEG (oligo(éthylène glycol)) sont greffés à la surface du substrat à fonctionnaliser et agissent comme un coussin empêchant ainsi les protéines ou les cellules d'adhérer. C'est d'une part l'encombrement stérique des PEG¹⁴ et d'autre part leur hydratation¹⁵ qui permet de diminuer fortement l'adhésion non spécifique. Une plateforme idéale de fonctionnalisation serait constituée d'un mélange de fonctions hydroxyle (pour leur capacité à ne pas être ionisées et à être fortement hydratées) et d'oligo(éthylène glycol), avec une faible quantité d'un autre groupement permettant de fonctionnaliser la surface.

Une autre approche permettant de limiter l'adhésion non spécifique des cellules sur les surfaces est l'utilisation de la phosphorylcholine (phosphate + choline) (Schéma 7).

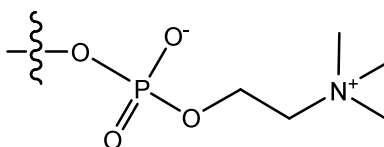


Schéma 7 : formule du groupement phosphorylcholine composé d'un phosphate et d'une choline.

Ce sont les propriétés zwiterioniques de ce groupement qui lui confère ses propriétés non-adhésives.

Cette molécule peut être greffée sur un polymère qui imitera alors une membrane biologique permettant de réduire l'adsorption des protéines et l'adhésion des cellules (Schéma 8).¹⁶

¹² Dalsin, J.L. ; Messersmith, P.B. *Material Today*, **2005**, *9*, 38-46.

¹³ Lee, J.H. ; Kopecek, J. ; Andrade, J.D. *J. Biomed. Mater. Res.* **1989**, *23*, 351-368.

¹⁴ Jeon, S.I. ; Lee, J.H. ; Andrade, J.D. ; De Gennes, P.G. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149-158.

¹⁵ Herrwerth, S. ; Eck, W. ; Reinhardt, S. ; Grunze, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9359-9366.

¹⁶ Iwasaki, Y. ; Ishihara, K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 534-546.

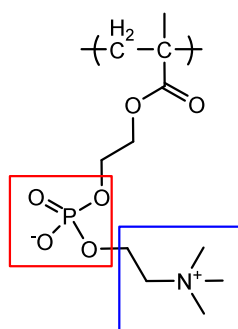


Schéma 8 : Formule du poly (2-méthacryloyloxyethyl phosphorylcholine)¹⁶

Par ailleurs, la phosphatidylcholine est une molécule lipidique, formée à partir d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux acides gras (Schéma 9).

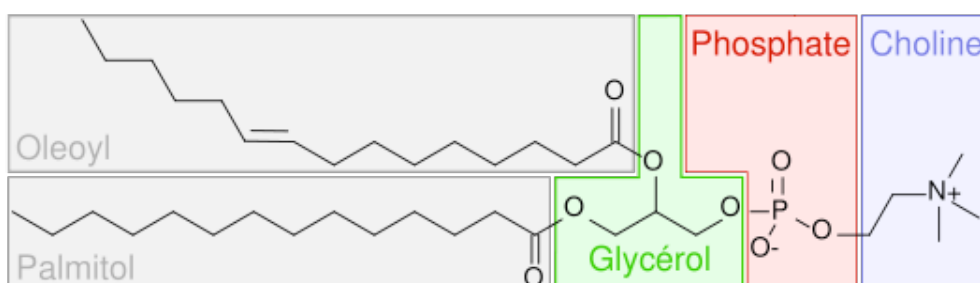


Schéma 9 : Un exemple de phosphatidylcholine : la palmitoyl-oleoyl-sn-phosphatidylcholine qui comporte un acide gras saturé et un acide gras insaturé.

La tête polaire zwitterionique¹⁷ de cette molécule lui confère des propriétés non-adhésives utilisées dans les organismes vivants : la membrane des cellules du sang par exemple contient une majorité de phosphatidylcholine ce qui permet au sang de ne pas coaguler. Afin de former une surface non adhésive, des molécules de phosphatidylcholine, qui forment spontanément des vésicules en solution, peuvent fusionner en bicouche au contact de la surface.

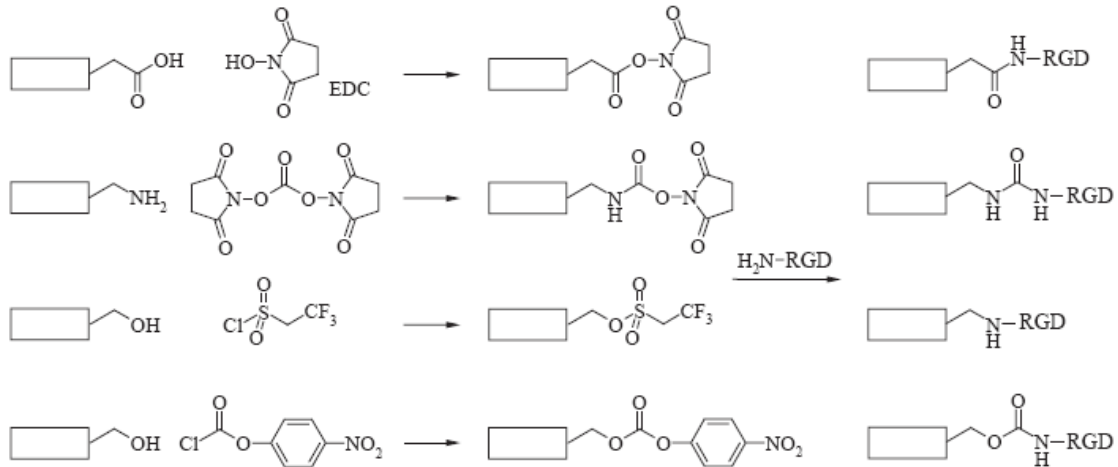
b. Greffage covalent de la molécule d'intérêt sur une couche de polymère.

Il existe dans la littérature de nombreux exemples de fonctionnalisation de polymères par des ligands peptidiques -RGD-.⁸ Le couplage covalent du ligand est le plus souvent assuré par l'intermédiaire de groupements fonctionnels carboxyles. Lorsque les polymères ne présentent pas ces groupes fonctionnels, ces derniers sont alors introduits par d'autres molécules : par mélange de polymères, par copolymérisation ou par traitement chimique. Le

¹⁷ Hayward, J.A. ; Chapman, D. *Biomaterials* **1984**, 5, 135-142.

Schéma 10 présente quelques exemples de méthodes de couplage covalent de ligands sur des polymères.

A)



B)

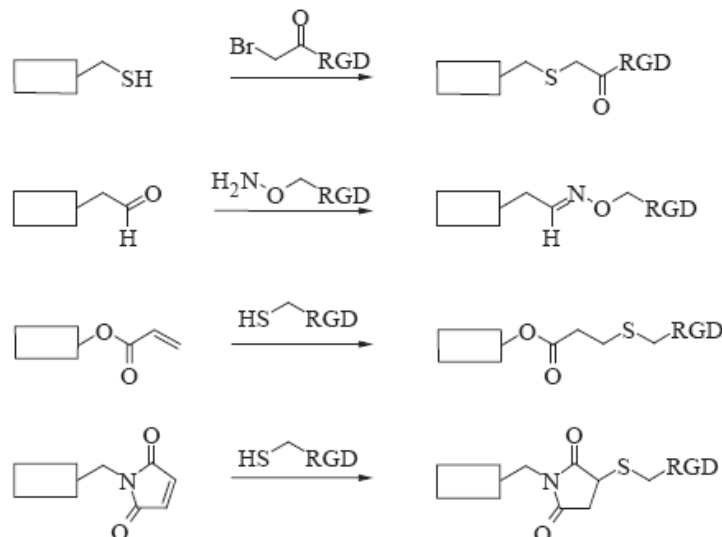


Schéma 10 : Exemples de méthodes de couplages covalents sur des polymères : A) impliquant des groupes carboxyl, amino ou hydroxyl des polymères, B) par ligation chimiosélective.⁸

Les polymères naturels les plus étudiés sont des polysaccharides, comme la cellulose ou le dextran, fortement hydrophiles grâce à leurs nombreuses fonctions hydroxyles. En particulier, des surfaces de dextran carboxyméthylé sont commercialisées pour la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) BIAcore. Le dextran est connu pour bien résister à l'adsorption non spécifique des protéines et ainsi permettre l'étude des interactions spécifiques ; les groupes carboxyles permettent de greffer un ligand par couplage covalent afin de mesurer son affinité avec des protéines ou des cellules. Un ligand -RGD- linéaire a été

ainsi immobilisé par le côté N-terminal sur les fonctions carboxyliques du dextran (Schéma 11) et a alors permis de stimuler l'adhésion cellulaire.¹⁸

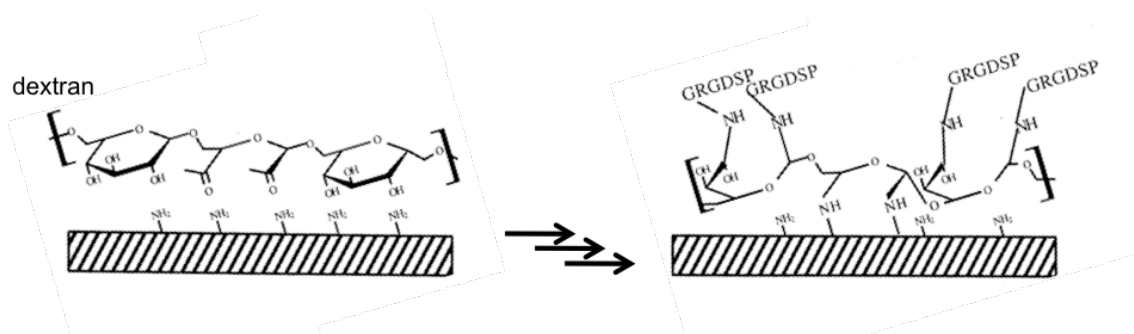


Schéma 11 : Fonctionnalisation d'une surface par des ligands -RGD- via un polymère de dextran.¹⁸

Le greffage de ligands -RGD- a également été réalisé sur une couche de polymères synthétiques.⁸ Des mélanges de polymères peuvent alors être utilisés afin de combiner différentes propriétés ou fonctionnalités. Par exemple, des copolymères de poly-L-lysine (PLL) et de PEG ont été fonctionnalisés par des ligands -RGD-^{19,20,21} (Schéma 12). Ce copolymère polycationique s'adsorbe sur des surfaces anioniques comme les oxydes métalliques. Il stimule alors les interactions spécifiques avec des cellules tout en prévenant les adsorptions non spécifiques de protéines grâce aux chaînes de PEG.

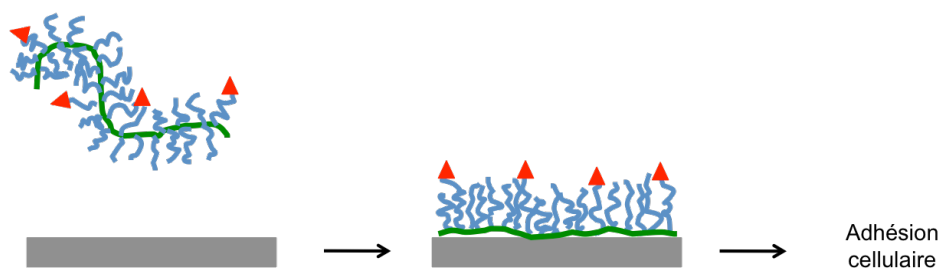


Schéma 12 : Une surface de TiO₂ a été modifiée par un copolymère de PLL (en vert) et de PEG (en bleu) dont un certain pourcentage a été substitué par des ligands peptidiques (en rouge). Des tests d'adhésion cellulaire ont ensuite été réalisés sur ces surfaces fonctionnelles.²¹

La technique d'assemblage par formation de multicouches de polyélectrolytes (LbL pour layer-by-layer en anglais) a également été utilisée pour fonctionnaliser des surfaces avec des ligands -RGD-, avec des polymères alternativement chargés positivement et négativement. La poly-L-lysine et le poly-L-acide glutamique ont par exemple été utilisés

¹⁸ Massia, S.P. ; Stark, J. J. *Biomed. Mater. Res.* **2001**, *56*, 390-399.

¹⁹ Schuler, M. ; Owen, G.R. ; Hamilton, D.W. ; de Wild, M. ; Textor, M. ; Brunette, D.M. ; Tosatti, S.G.P. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 4003-4015.

²⁰ Guillaume-Gentil, O. ; Akiyama, Y. ; Schuler, M. ; Tang, C. ; Textor, M. ; Yamato, M. ; Okano, T. ; Vörös, J. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 560-565.

²¹ Thid, D. ; Bally, M. ; Holm, K. ; Chessari, S. ; Tosatti, S. ; Textor, M. ; Gold, J. *Langmuir*, **2007**, *23*, 11693-11704.

pour former une multicouche adhésive. La fonctionnalisation par un ligand peptidique a été faite par les chaînes latérales des acides aminés, par l'intermédiaire d'un pont disulfure par exemple.²² L'influence de la densité de greffage sur l'adhésion, l'étalement et/ou la migration a alors été évalué.

Par ailleurs, le couplage direct de ligand sur la surface peut être envisagé. Des couplages covalents avec les surfaces de matériaux inorganiques (quartz ou oxydes métalliques) ont permis d'immobiliser des ligands peptidiques. Les processus mis en œuvre utilisent par exemple des aminosilanes. Ils permettent de former des monocouches bioactives et de contrôler les densités de greffage en ligand sur la surface.²³ L'équipe de H. Kessler a, par ailleurs, utilisé une méthode alternative de couplage covalent pour fixer un ligand peptidique sur un substrat de verre ; le couplage est basé sur la réaction entre un groupe terminal isothiocyanate du peptide modifié et des fonctions amine préalablement introduites sur la surface.²⁴

c. Incorporation de ligands dans une bicouche lipidique.

Les bicouches lipidiques, comme mimes de membranes biologiques, constituent une plateforme aux propriétés intéressantes pour l'étude des interactions biomoléculaires aux interfaces. Les protéines transmembranaires ou les peptides peuvent y être facilement incorporés ou greffés. Dans la plupart des études d'adhésion cellulaire sur bicouche lipidique, c'est l'utilisation de la phosphatidylcholine qui permet d'avoir une surface globalement inerte vis-à-vis de l'adhésion non spécifique des protéines ou des cellules. De par leur nature hydrophile d'une part et hydrophobe d'autre part, les phospholipides vont se structurer naturellement pour optimiser leur contact avec les molécules d'eau. Les modèles les plus courants de membranes biologiques sont les liposomes, les vésicules, les monocouches à l'interface air/eau ou les bicouches à l'interface solide/liquide. Les mono- ou bi-couches de lipides sont largement utilisées aujourd'hui pour fonctionnaliser un substrat grâce à la facilité et la rapidité de mise en œuvre par dépôt direct sur de nombreux types de surfaces solides²⁵. Les couches lipidiques peuvent être déposées sur les surfaces par différentes méthodes :

²² Chluba, J. ; Voegel, J.-C. ; Decher, G. ; Erbacher, P. ; Schaaf, P. ; Ogier, J. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 800-805.

²³ Massia, S.P. ; Hubbell, J.A. *J. Cell. Biol.* **1991**, 114, 1089-1100.

²⁴ Kalinina, S. ; Gliemann, H. ; Lopez-Garcia, M. ; Petershans, A. ; Auernheimer, J. ; Schimmel, T. ; Bruns, M. ; Schambony, A. ; Kessler, H. ; Wedlich, D. *Biomaterials*, **2008**, 29, 3004-3013.

²⁵ Brian, A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, 81, 6159-6163

dépôts de Langmuir-Blodgett, dépôts de Langmuir-Schäfer ou par fusion et étalement de vésicules. Pour les méthodes de Langmuir-Blodgett et de Langmuir-Schäfer, une monocouche de phospholipides se forme spontanément à l'interface air/eau pour optimiser les contacts avec l'eau. L'application d'une force latérale permet de compacter la monocouche qui est ensuite déposée sur un substrat. Le Schéma 13 illustre les méthodes de dépôts de Langmuir-Blodgett (A) et de Langmuir-Schäfer (B).

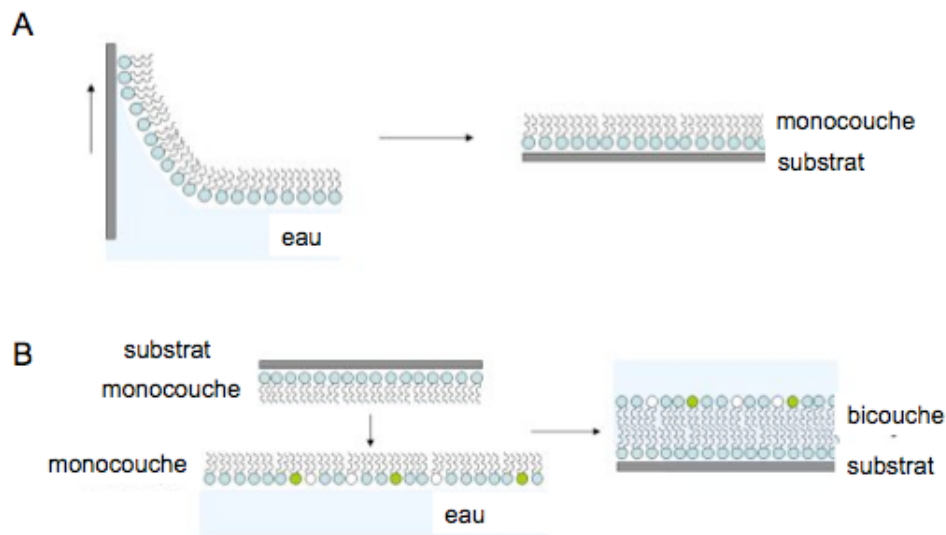


Schéma 13 : Illustration des méthodes de Langmuir-Blodgett (A) et de Langmuir-Schäfer (B). La formation d'une monocouche dense et organisée de molécules amphiphiles à l'interface air/eau est préalablement nécessaire dans les deux cas.

Les vésicules unilamellaires, dans leur forme la plus simple, sont constituées d'une bicouche sphérique fermée qui sépare un compartiment intérieur de l'extérieur. Lorsque les vésicules sont mises en contact avec une surface hydrophile (silice ou mica) en concentration suffisante elles fusionnent alors spontanément pour former une bicouche sur la surface. Le Schéma 14 illustre le mécanisme de formation de la bicouche par cette méthode.



Schéma 14 : Principe de formation d'une bicouche par fusion et étalement de vésicules sur une surface de silice ou de mica. Lorsque que la concentration critique en vésicules est atteinte sur la surface, elles fusionnent entre elles et s'étalent pour former la bicouche.

Différents types de modèle de bicouche peuvent ainsi être obtenues en fonction de la méthode utilisée. On retrouve par exemple, en fonction du support utilisé, des bicouches

hybrides alcanethiol-phospholipide (1)²⁶, des bicouches lipidiques suspendues (2)²⁷ sur or ou des bicouches lipidiques supportées (3)^{28,29} sur silice ou mica (Schéma 15).

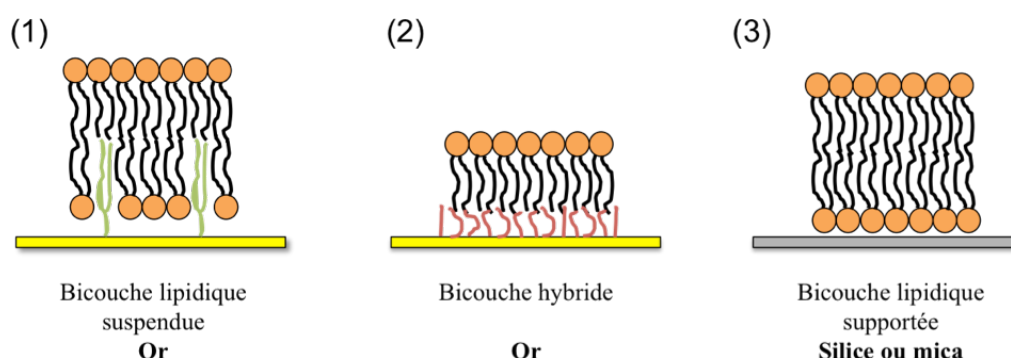


Schéma 15 : Représentations schématiques de bicouches lipidiques sur différents supports solides.

Les bicouches lipidiques présentées dans le Schéma 15 sont formées soit sur une surface d'or préalablement fonctionnalisée par des thiols à doubles chaînes lipidiques (1) ou par une monocouche auto-assemblée d'alcanethiols (2), soit sur une surface hydrophile de silice ou de mica (3). Les bicouches lipidiques ainsi formées ont un comportement similaire à celui des membranes biologiques. Ce ne sont pas des couches statiques de molécules rigidement maintenues en place puisque les lipides peuvent dériver latéralement.³⁰ Ces mouvements latéraux de diffusion des lipides confèrent aux membranes et aux bicouches leur fluidité tant que la température se situe au delà d'un point de fusion qui varie selon leur composition. En contrôlant la longueur des chaînes lipidiques et la présence ou non d'insaturation, il est donc possible de faire varier la fluidité de la bicouche. On obtient alors une plateforme d'étude facilement modulable en fonction de l'application visée. Afin de fonctionnaliser la bicouche, une protéine entière pourra être incorporée directement, de par ses propriétés hydrophobe et hydrophile qui lui permettent de s'insérer dans la membrane sans être dénaturée. Les bicouches de lipides ont été aussi utilisées comme support de ligands peptidiques. Trois approches différentes ont été décrites pour fonctionnaliser la bicouche. Un peptide hydrophile peut être greffé de façon covalente aux groupes fonctionnels de la membrane à l'interface lipide/eau³¹ ou par reconnaissance moléculaire spécifique (couplage aff

²⁶ Liebau, M. ; Bendas, G. ; Rothe, U. ; Neubert, R.H.H. *Sensors and Actuators B* **1998**, *47*, 239-245.

²⁷ Loessner, D. ; Kessler, H. ; Thumshirn, G. ; Dahmen, C. ; Wiltshi, B. ; Tanaka, M. ; Knoll, W. ; Sinner, E.K. ; Reuning, U. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4524-4533.

²⁸ Mashaghi, A. ; Swann, M. ; Popplewell, J. ; Textor, M. ; Reimhult, E. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3666-3676.

²⁹ Seantier, B. ; Kasemo, B. *Langmuir* **2009**, *25*, 5767-5772.

³⁰ Sackmann, E. *Science*, **1996**, *271*, 43-48.

³¹ Svedhem, S. ; Dahlborg, D. ; Ekeröth, J. ; Kelly, J. ; Höök, F. ; Gold, J. *Langmuir* **2003**, *19*, 6730-6736.

biotine/streptavidine)^{32,33} ou encore le peptide peut-être préalablement fonctionnalisé par deux chaînes hydrocarbonées hydrophobes puis incorporé dans la bicouche^{34,35}.

L'adhésion cellulaire a par exemple été étudiée sur des bicouches présentant des ligands peptidiques de séquence IKVAV (Isoleucine-Lysine-Valine-Alanine-Valine). Ces ligands, immobilisés sur la bicouche par formation d'un lien covalent entre une fonction thiol et une fonction maléimide, mime le site actif de la laminine. L'étude de l'adhésion et de la croissance cellulaire a été effectuée à différents pourcentages de ligands a permis d'élaborer des surfaces pour la culture cellulaire.³⁶ L'immobilisation de ces ligands sur les bicouches (ligand mobile sur la surface) a par ailleurs été comparée avec l'immobilisation sur un polymère (ligand non-mobile).²¹ Ces résultats ont montré d'une part que l'adhésion des cellules nécessite une concentration minimale de 3 pmol/cm² de ligands sur les deux types de surface et d'autre part que les cellules mettent plus de temps à s'étaler sur les bicouches lipidiques que sur les polymères mais que l'aire des cellules est finalement identique au bout de 24 heures.

Les molécules conjuguées peptide-lipide ont été introduites par M. Tirrell afin de combiner les systèmes de reconnaissance avec le principe d'auto-assemblage des bicouches.³⁷ La concentration en ligand et sa présentation pourront être contrôlées précisément. Par ailleurs, la mobilité latérale des ligands sera préservée permettant ainsi de mimer au mieux les systèmes biologiques dans l'étude de l'adhésion cellulaire par exemple.

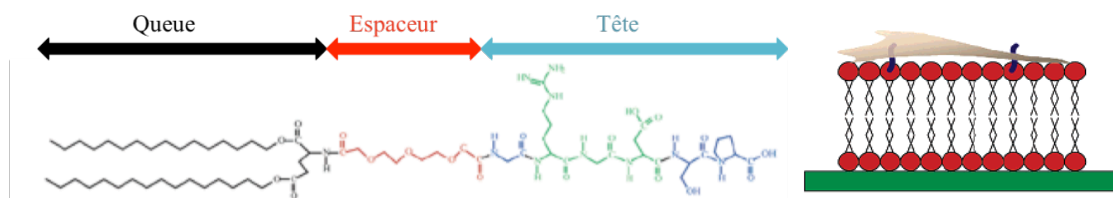


Schéma 16 : Structure chimique d'un peptide amphiphile et représentation schématique de l'adhésion d'un fibroblaste sur une bicouche lipidique de phosphatidylcholine contenant 5% de peptide amphiphile RGD.³⁹

³² Reviakine, I.; Brisson, A. *Langmuir* **2001**, *17*, 8293-8299.

³³ Richter, R. P.; Brisson, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 1632-1640.

³⁴ Ochsenhirt, S.E. ; Kokkoli, E. ; McCarthy, J.B. ; Tirrell, M. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 3863-3874.

³⁵ Worsfold, O. ; Voelker, N.H. ; Nishiya, T. *Langmuir*, **2006**, *22*, 7078-7083.

³⁶ Thid, D. ; Holm, K. ; Eriksson, P.S. ; Ekeroth, J. ; Kasemo, B. ; Gold, J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2008**, *84A*, 940-953.

³⁷ Berndt, P. ; Fields, G.B. ; Tirrell, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9515-9522.

Le ligand -RGD- (sous forme linéaire ou cyclique) greffé sur des lipides a été inclus dans des bicouches hybrides³⁸ ou des bicouches lipidiques supportées^{39,40} (Schéma 16) afin d'étudier par exemple l'influence du pourcentage de greffage ou de la cyclisation du -RGD- sur l'adhésion et l'étalement cellulaire (Figure 1). Dans ce dernier exemple, les ligands peptidiques sont greffés sur des chaînes carbonées hydrophobes par l'intermédiaire d'une courte chaîne d'OEG. Les motifs éthylène glycol permettent ici de diminuer l'adhésion non spécifique des cellules principalement observée avec les très faibles pourcentages de ligands.

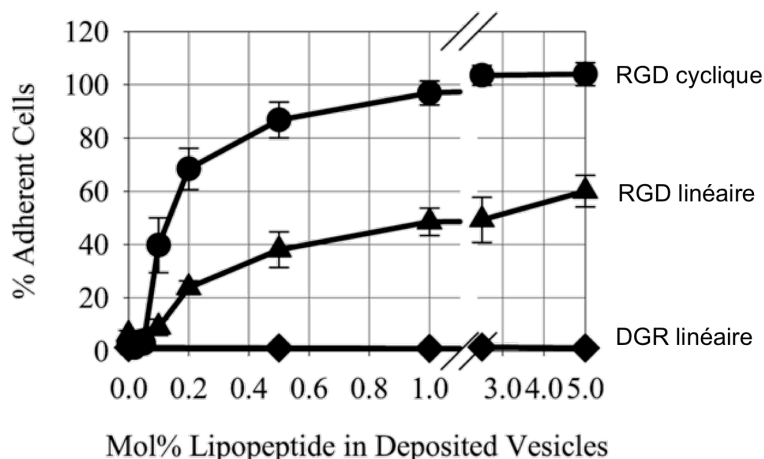


Figure 1 : Comparaison du nombre de cellules adhérentes sur des bicouches lipidiques supportées présentant un ligand -RGD- (cyclique ou linéaire) ou le ligand de contrôle -DGR- à différents pourcentages⁴⁰.

Néanmoins, ce mode de fonctionnalisation de surface présente un inconvénient dû au fait que la bicouche ne peut pas être séchée et doit toujours être maintenue en contact avec une solution aqueuse électrolytique.

d. Monocouches autoassemblées d'alcanethiol

La technique de fonctionnalisation des monocouches auto-assemblées (SAM pour Self-Assembled Monolayer) constitue un excellent outil pour générer des films monomoléculaires de molécules biologiques sur une grande variété de substrat.

Les monocouches auto-assemblées sont formées par l'adsorption de molécules organiques sur une surface qui peuvent s'organiser ensuite spontanément en une structure cristalline ou semi-cristalline. Les molécules qui forment la SAM possèdent un groupe fonctionnel qui a une forte affinité pour le substrat. Cette définition très vaste englobe de

³⁸ Marchi-Artzner, V. ; Lorz, B. ; Hellerer, U. ; Kantlehner, M. ; Kessler, H. ; Sackmann, E. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1095-1101.

³⁹ Stroumpoulis, D. ; Zhang, H. ; Rubalcava, L. ; Gliem, J. ; Tirell, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 3849-3856.

⁴⁰ Jensen, T.W. ; Hu, B.-H. ; Delatore, S.M. ; Garcia, A.S. ; Messersmith, P.B. ; Miller, W.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15223-15230.

multiples phénomènes d'adsorption. Différents groupes (amine, alcool, sulfure, sélénium, silicium, phosphate...) peuvent se lier à différents substrats métalliques (Au, Ag, Ni, Cu...), oxydes métalliques (SiO₂, TiO₂, Al₂O₃...) ou semi-conducteurs (CdTe, CdSe, GaAs...). Le système le plus ancien et le plus étudié est l'adsorption d'alcanethiol sur l'or^{41,42} dont le mécanisme de couplage sur or est présenté comme une addition oxydative d'une liaison S-H suivi d'une élimination réductrice d'hydrogène conduisant à la formation d'un thiolate :



Les avantages de l'utilisation de ce système sont multiples. L'or est un matériau relativement inerte et ne présente pas de phénomène de corrosion. Les films d'or sont des substrats classiques utilisés dans de nombreuses techniques de caractérisation de surface et ils ne sont pas toxiques vis-à-vis des cellules ce qui permet de les utiliser dans l'étude des interactions biologiques. Les thiols (R-SH), les sulfures (R-S-R) et les disulfures (R-S-S-R) s'auto-assemblent rapidement sur l'or (moins d'une heure) par leur simple mise en contact avec la surface. Dans le cas où les thiols présentent une longue chaîne alkyle (>10), la SAM formée a une structure cristalline : une fois que les molécules sont adsorbées sur la surface, elles se réorganisent pour donner une monocouche parfaitement ordonnée. Ce processus prend plusieurs heures après l'adsorption initiale de la couche. Des défauts peuvent être détectés mais en général, au moins 99% de la surface est recouverte. En utilisant un mélange de thiols, on obtient une couche mixte dont la composition reflètera plus ou moins la concentration en solution des deux espèces (Schéma 17).

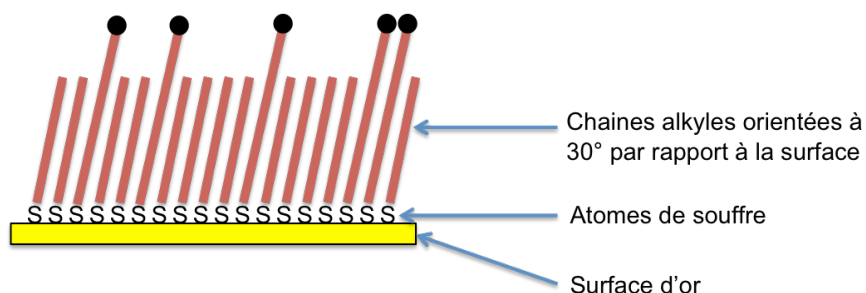


Schéma 17 : Représentation d'une SAM mixte d'alcanethiols sur une surface d'or.

Les propriétés physiques et chimiques des SAM peuvent être facilement adaptées en incorporant différentes fonctions sur la position terminale des alcanethiols et en formant des

⁴¹ Nuzzo, R.G. ; Allara, D.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481-4483.

⁴² Bain, C.D., Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7164-7175.

couches mixtes. G. Whitesides a démontré au début des années 90 que la fonctionnalisation des SAM avec des groupements éthylène glycol permettait de limiter l'adhésion non spécifique des protéines.^{43,44} Un nombre d'OEG compris entre trois et six motifs éthylène glycol permet de limiter l'adhésion non spécifique. La formation de SAM mixtes avec des alcanethiols présentant des groupements OEG-OH et OEG-ligand d'intérêt a permis d'étudier les interactions biomoléculaires spécifiques avec des protéines ou des cellules. L'analyte ne réagit alors qu'avec le ligand, sans interférence non spécifique du support. Il a été montré que le nombre de motifs éthylène glycol est très important dans le processus d'adhésion cellulaire, les ligands RGD devant rester accessible et ne pas être enfouis dans la couche d'OEG-OH environnante.⁴⁵

Le couplage avec le ligand d'intérêt peut se faire avant⁴⁵ ou après formation de la SAM. Dans le cas où la couche mixte est préalablement formée, de multiples réactions chimiosélectives peuvent ensuite être utilisées pour la fonctionnalisation : formation d'un lien amide⁴⁶ (A) ou d'un lien oxime⁴⁷ (B), cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens⁴⁸ (C), réaction entre un maléimide et un thiol⁴⁹ (D), réaction de Diels-Alder^{50,51} (E) (Figure 2).

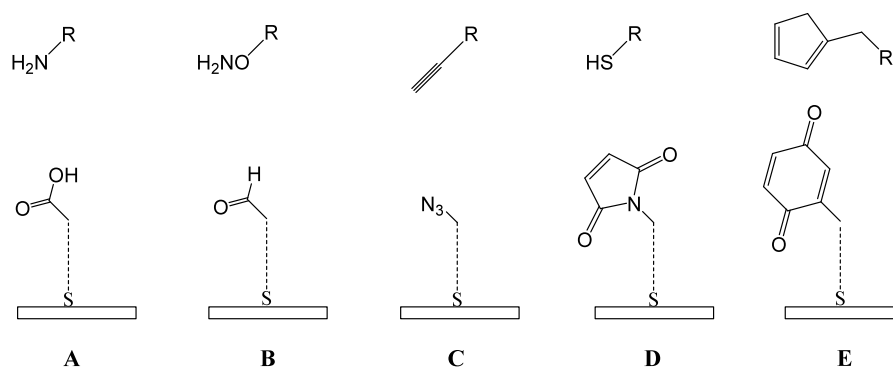


Figure 2 : Représentation des différentes possibilités de couplage d'une ligand R sur une SAM. A) lien amide B) lien oxime C) cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens D) thiol/maléimide E) réaction de Diels-Alder.

Chaque méthode d'immobilisation présente des avantages et des inconvénients. La formation du lien amide (A) se fait entre deux fonctions naturellement présentes dans

⁴³ Prime, K.L. ; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721.

⁴⁴ Ostuni, E. ; Yan, L. ; Whitesides, M. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **1999**, *15*, 3-30.

⁴⁵ Houseman, B.T. ; Mrksich, M. *Biomaterials* **2001**, *22*, 943-955.

⁴⁶ Choi, S. ; Murphy, W.L. *Langmuir*, **2008**, *24*, 6873-6880.

⁴⁷ Park, S. ; Yousaf, M.N. *Langmuir*, **2008**, *24*, 6201-6207.

⁴⁸ Hudalla, G.A. ; Murphy, W.L. *Langmuir*, **2009**, *25*, 5737-5746.

⁴⁹ Houseman, B.T. ; Gawalt, E.S. ; Mrksich, M. *Langmuir*, **2003**, *19*, 1522-1531.

⁵⁰ Mrksich, M. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 267-273.

⁵¹ Kato, M. ; Mrksich, M. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 2699-2707.

beaucoup de molécules biologiques mais nécessite l'activation de l'acide. Dans le couplage par lien oxime (B), la grande réactivité des oxyamines utilisées peut être source de réaction secondaire. La présence de cuivre dans la réaction de cycloaddition (C) peut s'avérer toxique par la suite lors de tests d'adhésion cellulaire, il est donc nécessaire de stabiliser le cuivre au degré d'oxydation (I). Le groupement thiol utilisé dans le couplage D peut être tout simplement celui d'une cystéine alors que les deux groupements utilisés dans la réaction de Diels-Alder (E) doivent être introduits. Le couplage E offre cependant la possibilité de suivre facilement la réaction par électrochimie en voltamétrie cyclique grâce au groupement redox quinone immobilisé sur la surface. La caractérisation électrochimique pour les autres types de couplage covalent est également possible par couplage avec une sonde redox fonctionnalisée avec un groupement précurseur ce qui permet alors d'évaluer le taux de greffage. Chaque situation devra donc être adaptée en fonction des ligands à étudier et des conditions expérimentales mises en œuvre.

Les méthodes présentées ici ont permis d'immobiliser des ligands -RGD- et d'étudier l'influence de différents paramètres de l'adhésion cellulaire. Ainsi, l'équipe de M. Mrksich⁴⁵ a étudié l'influence du nombre de motifs éthylène glycol du bras espaceur de l'alcanethiol présentant le ligand -RGD- et démontre que pour une densité donnée en -RGD-, l'augmentation du nombre de motif éthylène glycol diminue l'adhésion cellulaire.

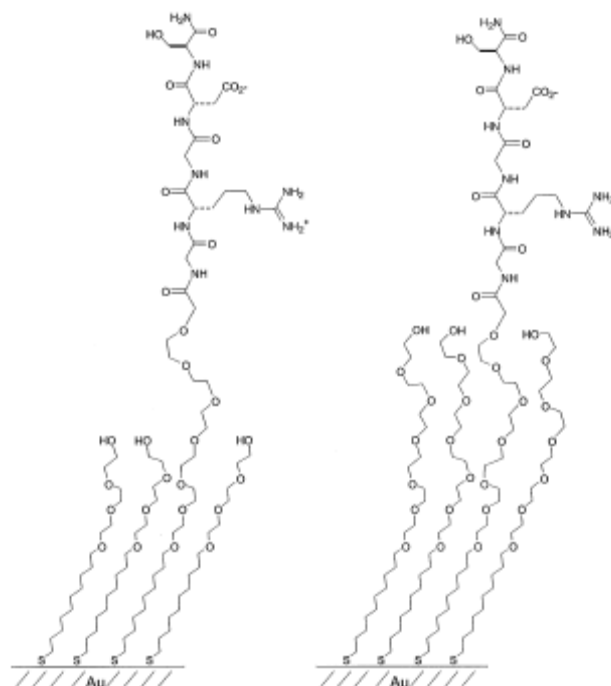


Schéma 18 : SAM fonctionnalisées par des ligands RGD et des groupes OEG de différentes longueurs⁴⁵.

W. Murphy⁴⁸, en mars 2009, a publié des travaux consacrés au couplage covalent de ligands -RGD- sur une SAM OEG. La méthode de couplage est une cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens entre un groupement azoture immobilisé sur la surface et une fonction alcyne portée par un ligand -RGD- linéaire. Il a analysé l'influence de la densité de greffage en ligand sur l'adhésion et l'étalement des cellules sur la SAM : il a ainsi démontré qu'un espace intermoléculaire des ligands de 36 nm (0,01%) est suffisant pour l'adhésion des cellules et un espace de 11 nm (0,05%) pour l'étalement. En utilisant le lien oxime, M. Yousaf a également immobilisé des ligands -RGD- sur des surfaces d'or fonctionnalisées par des SAMs :

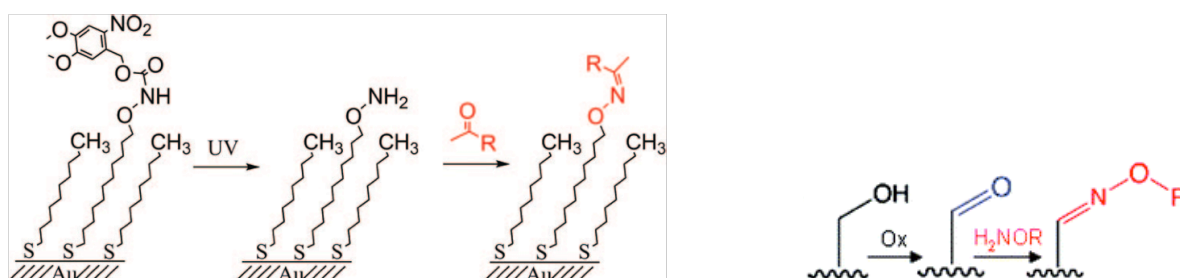


Schéma 19 : Méthode d'immobilisation de ligand étudiée par M. Yousaf. A gauche, photodéprotection de la fonction oxyamine avant réaction avec un ligand « R » présentant une fonction aldéhyde.⁴⁷ A droite, oxydation au PCC des fonctions alcool sur la surface avant réaction avec le ligand « R » porteur d'une fonction oxyamine.⁵² Dans les deux études, « R » est un ligand peptidique présentant la séquence -RGD-.

Différentes voies de formation du lien ont été testées :

- Les fonctions oxyamine (Schéma 19 à gauche) sont générées sur la surface par photodéprotection, le ligand est alors porteur d'une fonction aldéhyde.⁴⁷
- Les fonctions aldéhyde (Schéma 19 à droite) sont générées sur la surface par oxydation en présence de chloro-chromate de pyridinium (PCC), le ligand est alors porteur d'une fonction oxyamine.^{52,53}
- Des groupements quinone sont immobilisés sur les surfaces et réagissent avec les fonctions oxyamines présentes sur les ligands. La formation du lien peut alors être suivie et quantifiée directement par électrochimie.⁵⁴ En effet, les propriétés redox de la surface, liées au groupement quinone, évoluent au cours du couplage.

⁵² Westcott, N.P. ; Pulsipher, A. ; Lamb, B.M. ; Yousaf, M.N. *Langmuir*, **2008**, *24*, 9237-9240.

⁵³ Pulsipher, A. ; Yousaf, M.N. *Langmuir*, **2009**, in press.

⁵⁴ Chan, E.W.L. ; Yousaf, M.N. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15542-15546.

e. Fixation des ligands par couplage affin

Le couplage affin biotine/streptavidine est l'une des approches les plus utilisées pour immobiliser une biomolécule sur une surface. La streptavidine est une protéine tétramérique d'environ 60 000 Da.

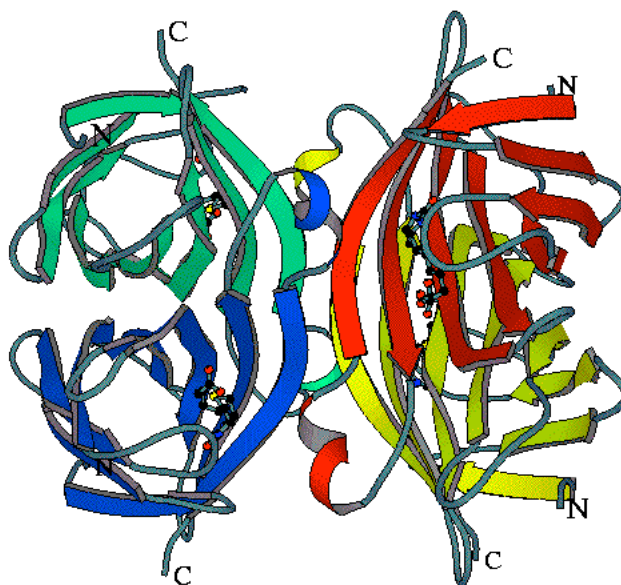


Schéma 20 : Représentation des quatre monomères de la streptavidine (bleu, rouge, vert, jaune) liés avec quatre molécules de biotine (issu de www.iob.uio.no).

Elle peut être schématisée par un parallélépipède rectangle de 54 x 58 x 48 Å, présentant donc une aire projetée sur la surface de 2500 Å². Elle possède quatre sites de liaison à la biotine localisés sur deux faces opposées et distants d'environ 20 Å (Schéma 21).⁵⁵

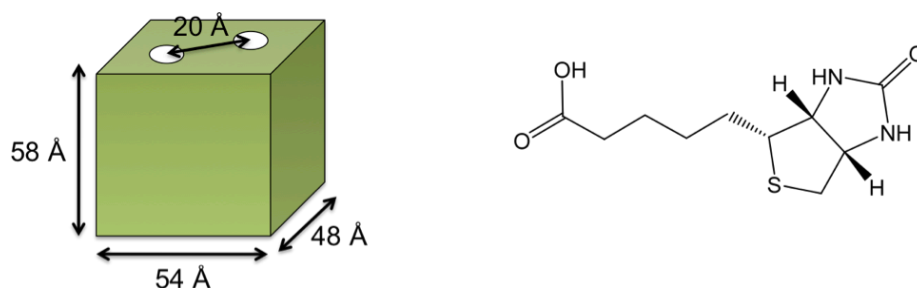


Schéma 21 : Dimensions caractéristiques de la streptavidine et formule développée de la biotine.

La forte affinité de la biotine pour la streptavidine ($K_{\text{aff}} = 10^{13} \text{ M}^{-1}$) justifie l'utilisation des plateformes de streptavidine pour l'immobilisation de biomolécules biotinylés et la

⁵⁵ Hendrickson, W.A. ; Pähler, A. Smith, J.L. ; Satow, Y. ; Merritt, E.A. ; Phizackerley, R.P. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1989**, 86, 2190-2194.

conception de biocapteurs. Les polymères, les phospholipides ou les alcanethiols préalablement fonctionnalisés avec une fonction biotine constituent les sous-couches de fixation de la protéine dans les exemples de la littérature. La streptavidine permet alors de faire la liaison entre le substrat modifié et le ligand biotinylé (Schéma 22).

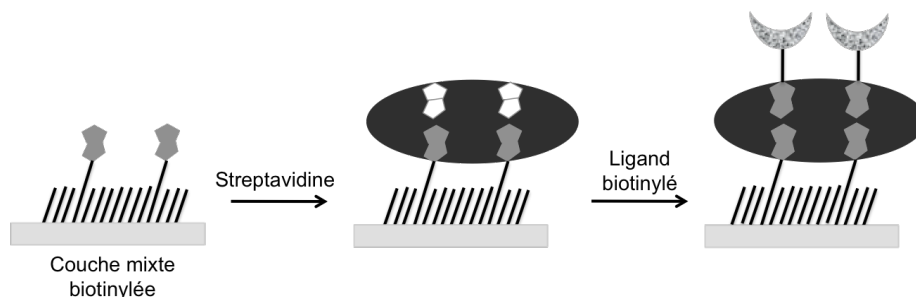


Schéma 22 : Exemple d'une SAM fonctionnalisée par couplage affiné : formation d'une couche mixte d'alcanethiol biotinylé diluée avec un alcanethiol hydroxyle, couplage avec la streptavidine et couplage avec le ligand biotinylé.

Des études de caractérisation de la couche de streptavidine ont été effectuées permettant par exemple de déterminer le pourcentage de biotine dans la SAM nécessaire à la formation d'une couche dense de streptavidine ou de comprendre l'organisation de l'assemblage de streptavidine.^{56,57} De nombreuses études d'interactions biomoléculaires ont été réalisées avec ce système de couplage du ligand, sur l'hybridation de l'ADN par exemple.⁵⁸ W. Knoll a étudié par QCM-D et par SPR l'assemblage d'un brin d'ADN biotinylé sur une couche de streptavidine puis l'hybridation avec un second brin d'ADN. Il a ainsi montré les avantages et les inconvénients des deux techniques pour les études de ce type d'assemblage moléculaire. Il a notamment établi un rapport de 1,2 entre la masse de la couche de streptavidine déterminée en QCM-D et en SPR, cette différence étant attribuée à l'hydratation de la couche qui n'est détectée que par QCM-D.⁵⁹ La préparation de surfaces adhésives par fonctionnalisation avec des ligands -RGD- a également été étudiée sur une SAM ; l'adhésion cellulaire a par exemple été étudiée sur des molécules de streptavidine modifiées qui présente le ligand -RGD- et immobilisées sur des SAMs biotinylées, l'adhésion cellulaire augmentant alors avec la quantité de ligands -RGD- immobilisés.^{60,61} Au laboratoire, des tests d'adhésion cellulaire ont été effectués sur des surfaces présentant des ligands biotinylés multivalents, présentant quatre

⁵⁶ Nelson, K.E. ; Gamble, L. ; Jing, L.S. ; Boekl, M.S. ; Naemi, E. ; Gollidge, S.L. ; Sasaki, T. ; Castner, O.G. ; Campbell, C.T. ; Stayton, P.S. *Langmuir* **2001**, *17*, 2807-2816.

⁵⁷ Perez-Luna, V.H. ; O'Brien, M.J. ; Opperman, K.A. ; Hampton, P.D. ; Lopez, G.P. ; Klumb, L.A. ; Stayton, P.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6469-6478.

⁵⁸ Shumaker-Parry, J.S. ; Zareie, M.H. ; Aebersold, R. ; Campbell, C.T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 918-929.

⁵⁹ Su, X. ; Wu, Y.-J. ; Knoll, W. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 719-726.

⁶⁰ McDevitt, T.C. ; Nelson, K.E. ; Stayton, P.S. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 391-396.

⁶¹ Anamelechi, C.C. ; Clermont, E.E. ; Brown, M.A. ; Truskey, G.A. ; Reichert, W.M. *Langmuir*, **2007**, *23*, 12583-12588.

motifs -RGD-, immobilisés sur une couche de streptavidine. Ces travaux ont permis de valider les propriétés multivalentes de ces ligands par rapport à des ligands monomériques.⁶² Ces différents exemples montrent qu'il est possible d'étudier l'adhésion cellulaire sur des ligands -RGD- immobilisés sur une surface de streptavidine.

3. Les différentes méthodes de caractérisation des interactions à l'interface solide/liquide - Application à l'adhésion cellulaire.

a. Introduction

Dans le cas particulier de l'adhésion d'une cellule sur la matrice extra-cellulaire, il y a d'abord formation des premières liaisons entre protéines membranaires de la classe des intégrines et protéines de la matrice (fibronectine, vitronectine...). Ces premières liaisons vont entraîner une signalisation intracellulaire conduisant à la consolidation de l'adhésion. La forme de la membrane va alors s'adapter à la surface pour permettre à la cellule de s'étaler en multipliant les points de contact (Figure 3).

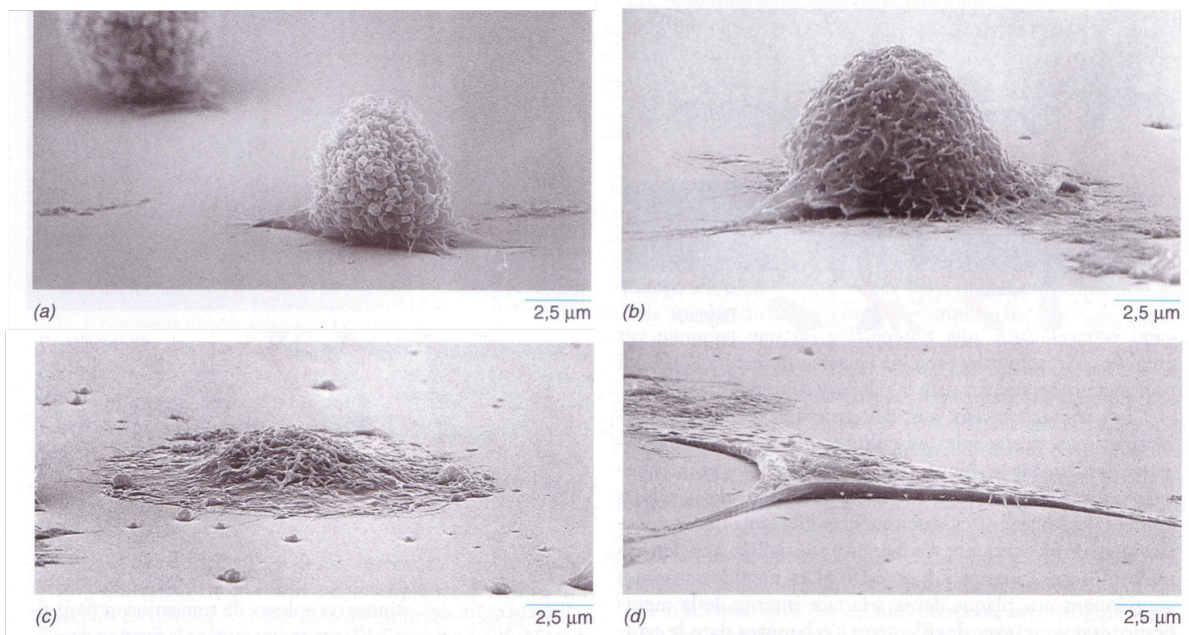


Figure 3 : Images en microscopie électronique à balayage de fibroblastes après a) 30 min, b) 60 min, c) 2h et d) 24h de contact avec une surface de verre⁶³.

Le cytosquelette joue un rôle très important dans le processus de l'adhésion cellulaire puisqu'il est le squelette de la cellule et le moteur des mouvements de la membrane. A la suite des premiers points de contact de la cellule avec son substrat (Figure 3, photo a), une

⁶² Boturyn, D. ; Coll, J.-L. ; Garanger, E. ; Favrot, M.-C. ; Dumy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730-5739.

⁶³ Karp, G. *Biologie cellulaire et moléculaire, Ed. De Boeck*, **2004**.

succession de signaux intracellulaires vont être activés. Ce phénomène provoque une migration des protéines d'adhésion vers le point de contact créant ainsi des points d'adhésion focale. Les mouvements de la membrane (formation de filopodes et de lamellipodes) grâce aux filaments d'actine conduisent ainsi à l'étalement et aux mouvements de la cellule (Figure 3, photos b, c et d).

Le processus d'adhésion et d'étalement d'une cellule est donc complexe et l'étude de ces processus impose donc certaines contraintes. En effet les cellules sont des objets volumineux (diamètre de l'ordre de la dizaine de micromètres), qui peuvent former des amas et qui adhèrent de façon non spécifique sur les surfaces rigides. De nombreuses techniques de caractérisation ont été développées récemment pour étudier l'adhésion cellulaire à l'interface solide/liquide. Les paramètres caractérisés, le milieu nécessaire, le marquage éventuel, la perturbation de l'échantillon et la résolution spatiale et temporelle varient en fonction de la technique utilisée. Parmi les techniques mises en œuvre pour caractériser le processus d'adhésion cellulaire on distingue d'une part les méthodes d'imagerie, comme la microscopie optique, la microscopie de force atomique et les différentes méthodes de fluorescence, qui permettent de fournir une information structurale locale à différentes échelles. D'autre part, les méthodes physico-chimiques, comme l'ellipsométrie, la résonance des plasmons de surface (SPR), le guide d'onde ou la microbalance à cristal de quartz (QCM), qui ne nécessitent aucun marquage, permettent de suivre en temps réel l'adsorption de molécules ou l'adhésion de cellules sur un substrat, de déterminer les paramètres thermodynamiques et cinétiques et pour certaines d'entre elles, de révéler les changements de conformation de la couche adsorbée à la surface. La complémentarité des méthodes optiques et physico-chimiques sera donc intéressante afin de caractériser au mieux les interactions biologiques. Les techniques de caractérisation des interactions biomoléculaires présentées dans la suite de ce chapitre se restreignent aux méthodes physiques mises en œuvre pour suivre et analyser le processus d'adhésion cellulaire sur une surface fonctionnelle.

b. Les techniques microscopiques

i. Microscopie optique

De par sa résolution la microscopie optique permet d'observer des objets jusqu'au micron à moins qu'ils ne soient marqués par une sonde fluorescente par exemple. De façon plus courante, les études en microscopie optique permettent de donner des informations structurales sur des cellules lors des tests d'interaction avec des surfaces. Elles permettent de

visualiser la forme des cellules et donc de déterminer si elles sont étalées ou non¹¹. Les paramètres classiques d'étude en microscopie sont le nombre et la densité de cellules ainsi que l'aire occupée par les cellules (pourcentage de surface couverte et aire occupée par une cellule). La microscopie optique est rarement exploitée seule^{64,65} et c'est la somme des informations obtenues par différentes techniques qui permet de tirer des conclusions quant aux interactions étudiées. En général, les mesures effectuées par les méthodes physico-chimiques sont confirmées par des photos des cellules sur les surfaces.

ii. Microscopie de fluorescence

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. Dans le cas de l'étude des processus cellulaires, il est nécessaire de marquer la molécule à suivre par un fluorochrome. La microscopie optique permet alors de visualiser les interactions protéiques dans des conditions de vie cellulaire par l'observation de la fluorescence. La microscopie de fluorescence permet de localiser les différents organites et donc de suivre les différents processus biologiques (activité protéique, division, étalement...). Le marquage spécifique de protéines ou de petites molécules permet par exemple de visualiser le processus d'internalisation de la molécule marquée ou les points d'adhésion focaux (marquage des protéines du cytosquelette). Le marquage spécifique de deux types de molécules par deux fluorochromes différents (double marquage) permet d'étudier les interactions qui peuvent exister entre ces deux molécules.

iii. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) fonctionne avec une pointe (sonde) de taille microscopique qui est approchée de la surface à imager avec une très grande précision. Au voisinage de la surface, la pointe est soumise à des forces qui dépendent de la nature de la pointe et de l'échantillon. Ces forces créent une déviation de la pointe qui est alors enregistrée par rétrocontrôle. L'AFM permet d'étudier le processus d'adhésion cellulaire mais également la force avec laquelle les cellules ont adhéré sur la surface^{66,67}. Elle offre un accès direct à l'observation *in situ* des cellules vivantes avec une résolution de l'ordre de l'Angström. Elle permet de déduire la topographie de la surface et donne des informations quantitatives sur la

⁶⁴ Marx, K.A. ; Zhou, T. ; Warren, M. ; Brauhut, S. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 987-999.

⁶⁵ Yanase, Y ; Suzuki, H ; Tsutsui, T ; Hiragun, T ; Kameyoshi, Y. ; Hide, M. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1081-1086.

⁶⁶ Benoit, M. ; Gaub, H.E. *Cells Tissues Organs* **2002**, *172*, 174-189.

⁶⁷ Simon, A. ; Durrieu, M.-C. *Micron* **2006**, *37*, 1-13.

force de l'adhésion cellulaire et sur les propriétés mécaniques des cellules. On peut ainsi en déduire l'avancement de l'étalement des cellules en observant les extensions de la membrane et les filaments du cytosquelette⁶⁸. L'avantage de cette technique est la possibilité d'imager des échantillons en solution aqueuse et donc en conditions quasi-naturelles. De plus, aucun traitement des échantillons n'est nécessaire et la technique est non destructrice. Cependant, le temps d'acquisition assez long de cette technique (de l'ordre de la minute par image) rend difficile l'étude des interactions en temps réel qui peuvent évoluer rapidement.

c. Les méthodes optiques évanescentes

Les méthodes optiques évanescentes tel que le guide d'onde⁶⁹ et la résonance plasmonique de surface (SPR) sont des outils de diagnostics hautement sélectifs pour la détection d'évènements aux interfaces.

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différent une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. Selon l'angle d'incidence du faisceau toute la lumière peut être réfléchi. En condition de réflexion totale, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde (Schéma 23). La zone balayée par l'onde est appelée champ évanescent.

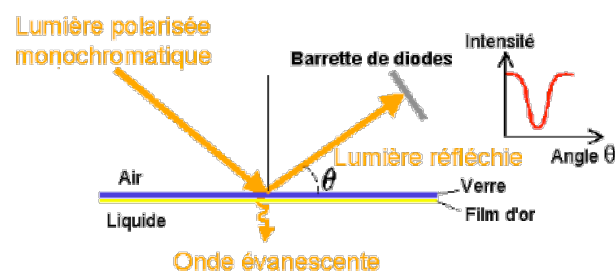


Schéma 23 : Illustration du principe de fonctionnement des méthodes optiques évanescentes.

L'utilisation de l'onde évanescente permet de sonder en temps réel les changements d'indice de réfraction de la surface liés par exemple à l'adsorption de molécules. Ces méthodes permettent de mettre en évidence l'interaction entre deux partenaires puis de quantifier cette interaction (affinité, constantes de vitesse, paramètres thermodynamiques,

⁶⁸ Marcotte, L. ; Tabrizian, M. *ITBM-RBM* **2008**, 29, 77-88.

⁶⁹ Ramsden, J.J. ; Li, S.-Y. ; Heinzle, E. ; Prenosil, J.E. *Cytometry* **1995**, 19, 97-102.

quantités immobilisées). Aucun marqueur n'est nécessaire pour ces méthodes. Elles permettent de suivre et de caractériser l'adhésion et l'étalement cellulaire sur une surface de protéines⁷⁰ ou sur un ligand multivalent⁷¹, immobilisés sur une surface de dextran par exemple. Cependant, les études d'adhésion cellulaire effectuées avec ces techniques doivent être interprétées avec précaution puisque tout le volume des cellules (10 à 30 µm de diamètre) n'est pas sondé par l'onde évanescente (propagation 100 à 200 nm).

d. La microbalance à cristal de quartz

i. Principe de la méthode

La microbalance à quartz (QCM) est une méthode acoustique basée sur l'effet piézoélectrique. Développée dans les années 50, les mesures de QCM établissent une corrélation entre les changements de fréquence d'un cristal de quartz piézoélectrique et les variations de masse du quartz. La méthode est basée sur la mesure du comportement de résonance d'un oscillateur à cristal de quartz en mode de cisaillement. Un disque fin de quartz est pris en sandwich entre deux électrodes d'or et les oscillations mécaniques sont induites par application d'un courant alternatif entre les deux électrodes. En 1959, Sauerbrey⁷² montre qu'il existe une relation linéaire simple entre les variations de fréquence observées ΔF et la masse déposée sur la surface Δm :

$$\Delta m = -C \frac{\Delta f n}{n} \quad \text{avec} \quad C = \frac{v_q \rho_q}{2 f_0^2}$$

Equation de Sauerbrey ; $C = 17,7 \text{ ng.Hz}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ est la constante de sensibilité massique pour un cristal de quartz dont la résonance fondamentale f_0 est de 5 MHz (v_q = vitesse de propagation du son dans le quartz et ρ_q = densité du quartz) ; $n = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13$ est l'harmonique utilisée.

Cette formule constitue le fondement de l'utilisation de la technique de QCM comme capteur de masse. Une diminution de la fréquence est interprétée comme une augmentation de la masse adsorbée sur le quartz. Dans les années 80, il a été démontré que la technique QCM pouvait être utilisée pour des applications en phase liquide. Il devenait alors nécessaire de suivre l'amortissement des oscillations du cristal lié aux pertes visqueuses dans une couche organique hydratée et non-rigide et d'utiliser un autre modèle d'analyse des données ainsi obtenues. L'équation de Sauerbrey n'est en effet valable que dans le cas de films minces,

⁷⁰ Vörös, J. ; Ramsden, J.J. ; Csucs, G. ; Szendro, I. ; De Paul, S.M. ; Textor, M. ; Spencer, N.D. *Biomaterials*, **2002**, 23, 3699-3710.

⁷¹ Gestwicki, J.E. ; Cairo, C.W. ; Mann, D.A. ; Owen, R.M. ; Kiessling, L.L. *Anal. Biochem.* **2002**, 305, 149-155.

⁷² Sauerbrey, G. *Z. Phys.* **1959**, 155, 206-222.

rigides et homogènes qui suivent de façon solidaire les vibrations du quartz. Ces informations sur les propriétés viscoélastiques de la couche sont obtenues soit par la mesure de résistance R dans la technique de spectroscopie d'impédance,^{73,74} soit par le suivi de la dissipation d'énergie dans le film visqueux en enregistrant la décroissance des oscillations libre du cristal après coupure de la source d'excitation.^{75,76} Cette extension de la technique, appelée QCM-D (pour Quartz Cristal Microbalance with Dissipation monitoring), consiste à n'appliquer le signal d'excitation sinusoïdale que pendant des intervalles de temps très brefs de l'ordre de la microseconde (Schéma 24). La dissipation est définie comme un rapport d'énergie et n'a donc pas d'unité.

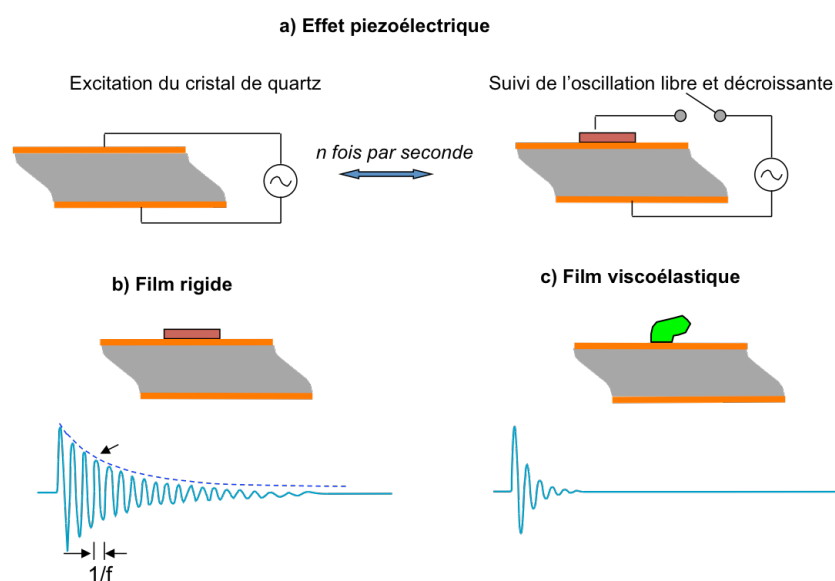


Schéma 24 : Présentation schématique du fonctionnement de la QCM-D. a) Effet piézoélectrique inverse : l'application d'un courant alternatif induit des oscillations mécaniques et la mesure des caractéristiques de ces oscillations permet de déterminer les facteurs de fréquence et de dissipation. b) Oscillations obtenues dans le cas d'un film rigide. c) Oscillations obtenues dans le cas d'un film viscoélastique.

Les variations de fréquence et de dissipation permettent d'avoir des informations en temps réels sur les processus d'adsorption et les changements structuraux des couches déposées. Les mesures de fréquence et de dissipation sont faites à la fréquence fondamentale de résonance du cristal de quartz (5 MHz). Hormis l'oscillation en mode fondamentale ($n = 1$), d'autres harmoniques peuvent également être excitées avec $f_n = n f_0$ et $n = 3, 5, 7, 9, 11, 13$ étant le numéro de l'harmonique. A partir des mesures effectuées, l'application du modèle de

⁷³ Yang, M. ; Thompson, M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1158-1168.

⁷⁴ Janshoff, A. ; Galla, H.-J. ; Steinem, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4004-4032.

⁷⁵ Rodahl, M. ; Kasemo, B. *Sensors and Actuators A* **1996**, *54*, 448-456.

⁷⁶ Höök, F. ; Kasemo, B. *Springer Ser. Chem. Sens. Biosens.* **2007**, *5*, 425-447.

Voïnova^{77,78} permet de déterminer les propriétés de la couche formée comme la masse et les paramètres viscoélastiques (viscosité et module de cisaillement). La résolution massique des appareils de la société Q-Sense utilisés au laboratoire est comprise entre 5 ng/cm² (pour le modèle D-300) et 0,5 ng/cm² (pour les modèles E-1 et E-4).

Avec cette technique, il est possible de travailler sur différents matériaux qui viendront recouvrir le cristal comme l'or, l'oxyde de silice (SiO₂), de titane (TiO₂) ou le mica permettant ainsi d'utiliser différentes méthodes de fonctionnalisation.

Il faut noter qu'en QCM-D la masse mesurée inclut l'eau d'hydratation et les contre-ions liés à la matière adsorbée. Ceci constitue une différence importante par rapport aux techniques optiques comme la résonance plasmonique de surface ou l'ellipsométrie. La masse mesurée est surestimée par rapport à la masse organique sèche dans le cas de la QCM-D. C'est par exemple le cas lors de l'adsorption d'une couche de protéines qui sera fortement hydratée. La quantité d'eau dans un film adsorbé peut aller jusqu'à 95 %. La comparaison avec des valeurs obtenues par électrochimie ou par ellipsométrie sera donc intéressante.

ii. Application à l'adhésion cellulaire

La QCM en milieu liquide a d'abord été appliquée principalement aux domaines de recherche concernant l'adsorption de protéines. Les mesures étaient alors basées seulement sur les variations de fréquence associées au changement de masse du quartz. Dans les années 90, la technique a été perfectionnée grâce au suivi simultané du changement de masse et du comportement viscoélastique (par la mesure de R ou de D) de la couche organique fixée sur la surface. Le développement de la QCM a alors conduit les chercheurs à évaluer les performances de cette technique pour étudier les phénomènes d'adhésion^{79,80}, de croissance⁸¹ et de détachement⁸² cellulaire. Elle est principalement utilisée pour la mise au point de nouveaux biomatériaux (interactions non spécifiques) mais aussi pour les études d'interactions spécifiques avec un ligand greffé sur la surface. Nous avons vu précédemment que l'équation de Sauerbrey s'applique à un film fin et rigide couplé au résonateur, or une couche de cellules adhérentes ne se comporte pas comme une couche rigide, mais pas non

⁷⁷ Voinova, M.V. ; Rodahl, M. ; Jonson, M. ; Kasemo, B. *Physica Scripta* **1999**, *59*, 391-396.

⁷⁸ Rodahl, M. ; Höök, F. ; Fredriksson, C. ; Keller, C.A. ; Krozer, A. ; Brzezinski, P. ; Voinova, M. ; Kasemo, B. *Faraday Discuss.* **1997**, *107*, 229-246.

⁷⁹ Redepenning, J. ; Schlesinger, T.K. ; Mechalke, E.J. ; Puleo, D.A. ; Bizios, R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3378-3381.

⁸⁰ Fredriksson, C. ; Kihlman, S. ; Rodahl, M. ; Kasemo, B. *Langmuir*, **1998**, *14*, 248-251.

⁸¹ Nivens, D.E. ; Chambers, J.Q. ; Anderson, T.R. ; White, D.C. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 85-89.

⁸² Gryte, D.M. ; Ward, M.D. ; Hu W.-S. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9*, 105-108.

plus comme une couche uniforme entièrement viscoélastique.⁸³ De plus, l'onde électroacoustique de cisaillement se propage sur environ 0,25 μm (pour la fréquence fondamentale $F = 5 \text{ MHz}$) alors que le diamètre d'une cellule ronde est d'environ 10 μm . Toute la cellule n'est donc pas sondée et il est impossible de relier les variations de fréquence et de dissipation à la masse cellulaire adhérente. Cependant, il est largement admis que la technique de QCM-D est sensible au nombre de cellules adhérentes mais également à l'aire de la cellule en contact avec le transducteur, c'est à dire à son étalement. La QCM est surtout sensible aux modifications très près de la surface comme le nombre de sites d'adhésion, les mouvements dans la membrane et les changements du cytosquelette. Elle permet donc de caractériser les interactions des cellules avec la surface du cristal de quartz. En mesurant la fréquence de vibration d'une surface d'or au contact d'une suspension cellulaire et en la comparant aux images prises au microscope à différents temps, il a été montré qu'il existe une bonne corrélation entre les variations de fréquence et la fraction de surface couverte par les cellules⁷⁹. Plus le nombre de cellules injectées est important, plus la variation maximale de fréquence due à l'adhésion et à l'étalement augmente jusqu'à atteindre un palier lorsque les cellules arrivent à confluence sur la surface du cristal de quartz (Figure 4).⁸³

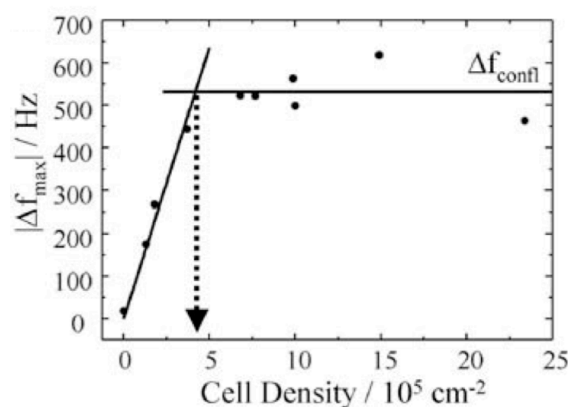


Figure 4 : Variations maximales de fréquence obtenues pour des injections d'un nombre de cellules croissant sur une surface d'or.⁸³

Tant que toutes les cellules peuvent trouver un site d'adhésion et s'étaler, la variation maximale de fréquence augmente avec le nombre de cellules injectées. Si le nombre de cellules injectées sur la surface continue d'augmenter, la variation maximale de fréquence est alors constante. Cette expérience montre que la QCM-D n'est sensible qu'aux phénomènes qui se déroulent à la surface et ne détecte pas les cellules supplémentaires qui sont au-dessus

⁸³ Heitmann, V. ; Reiss, B. ; Wegener, J. *Springer Ser. Chem. Sens. Biosens.* **2007**, 5, 303-338.

de la première monocouche de cellules. La relation entre la réponse de QCM-D et le nombre de cellules adhérentes a été confirmée par M. Foss en mesurant la variation de fréquence obtenue pour l'étalement de cellules sur des surfaces de chrome et l'aire des cellules à partir d'images obtenues par microscopie électronique à balayage⁸⁴ (Figure 5).

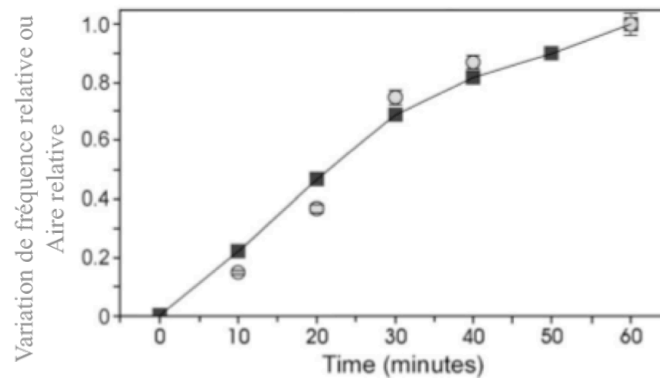


Figure 5 : Corrélation entre la variation de fréquence relative mesurée par QCM-D (carré noir) et l'aire des cellules relative mesurée par cryo-microscopie électronique à balayage (rond gris) au cours du temps pendant l'adhésion de cellules sur des surfaces de chrome.⁸⁴

Il a également montré que les variations de fréquence et de dissipation étaient fonction du nombre de cellules adhérent sur la surface. La Figure 6 présente les variations de fréquence (à gauche) et les variations de dissipation (à droite) en fonction de la concentration cellulaire dans la suspension injectée.

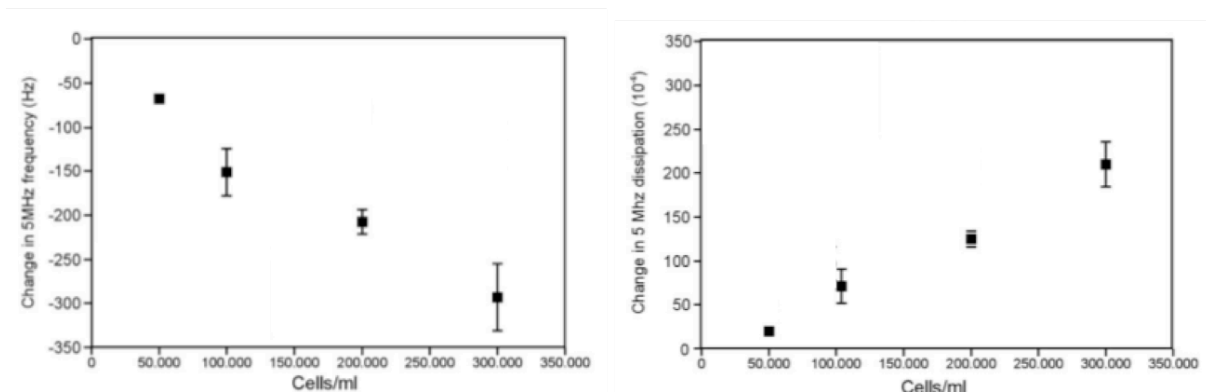


Figure 6 : Variations de fréquence (à gauche) et variations de dissipation (à droite) en fonction du nombre de cellules/mL dans la suspension injectée sur la surface. (Adaptée de ⁸⁴)

La sensibilité de la QCM-D (pour les variations de F et de D) est proportionnelle à l'amplitude de l'oscillation et donc à l'ordre de l'harmonique.⁷⁵ Cette sensibilité varie

⁸⁴ Modin, C ; Stranne, A.-L. ; Foss, M. ; Duch, M. ; Justesen, J. ; Chevallier, J. ; Andersen, L.K. ; Hemmersam, A.G. ; Pedersen, F.S., Besenbacher, F. *Biomaterials*, **2006**, 27, 1346-1354.

également selon une fonction gaussienne centrée sur le milieu de l'électrode. Ces deux paramètres posent donc un problème de comparaison des résultats en fonction de la position des cellules sur la surface. Afin de normaliser les données, le rapport de la variation de dissipation (ΔD) et de la variation de fréquence (ΔF) est un moyen de caractériser l'adhésion cellulaire. $|\Delta F|$ et ΔD varient de la même manière avec le nombre de cellules adhérentes, le rapport $\Delta D/\Delta F$ est donc indépendant du nombre de cellules et de leur distribution sur la surface. Cette représentation de $\Delta D = f(\Delta F)$ est souvent utilisée comme empreinte de l'adhésion cellulaire. En effet, ce rapport dépend de la masse effective de la couche, de ses propriétés viscoélastiques, de la structure interne et de la forme des cellules⁸⁰. La représentation des signaux sous forme $\Delta D = f(\Delta F)$ a permis de distinguer des cellules qui adhèrent et s'étalent sur une surface hydrophile de cellules qui restent sphériques sur une surface hydrophobe⁸⁵ (Figure 7).

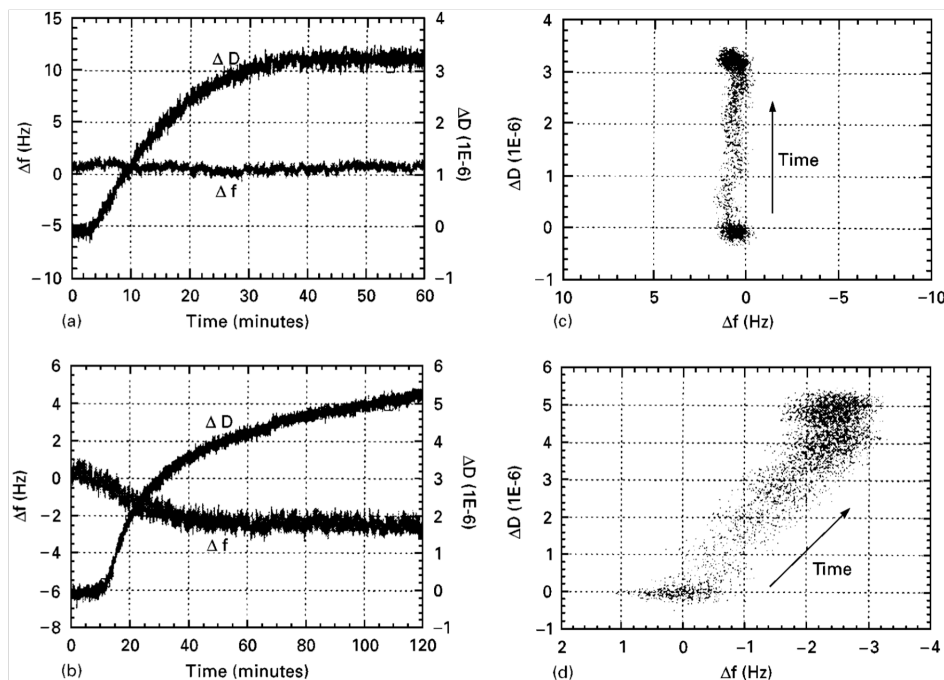


Figure 7 : (à gauche) Variations de fréquence et de dissipation en fonction du temps et (à droite) variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence pour des surfaces hydrophobes (en haut) ou hydrophiles (en bas).⁸⁵

La Figure 7 permet de comparer les pentes des droites de la variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence obtenues sur une surface hydrophobe (en haut) ou sur une surface hydrophile (en bas). Les observations au microscope ont permis de montrer que les cellules ne sont pas étalées sur la surface hydrophobe alors qu'elles ont une morphologie

⁸⁵ Fredriksson, C. ; Khilman, S. ; Kasemo, B. ; Steel, D.M. *J. Mat. Sciences : Materials in Medicine* **1998**, 9, 785-788.

étalée sur les surfaces hydrophiles. On peut donc en déduire que la pente de la droite $\Delta D = f(\Delta F)$ diminue lorsque les cellules sont étalées. De plus, la représentation de $\Delta D = f(\Delta F)$ permet d'identifier des changements de régime cinétique au cours du processus d'adhésion (Figure 8).

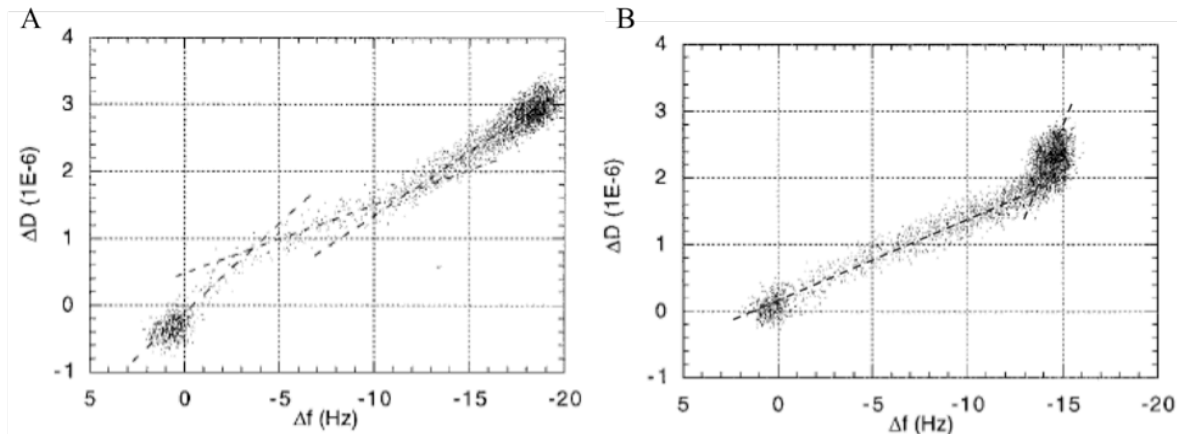


Figure 8 : Variations de dissipation en fonction de la variations de fréquence obtenues pour l'adhésion de cellules sur une surface de polystyrène hydrophobe (A) ou sur une surface de polystyrène hydrophile (B). Les changements de régime cinétique sont indiqués par des pointillés.

Le processus d'adhésion cellulaire peut être décomposé en cinq étapes qui doivent être prises en compte pour interpréter les signaux de QCM-D⁸⁰ :

- Contact physique initial.
- Sécrétion des protéines qui vont former la matrice extracellulaire.
- Étalement de la cellule conduisant à l'augmentation du nombre de point de contact et donc de l'aire de la surface de contact.
- Modification de la matrice extracellulaire conduisant à des changements de la force d'adhésion, du nombre de protéines adhérentes...
- Modification du cytosquelette qui influenceront la rigidité de la cellule (et affecteront donc principalement la dissipation).

Cependant, ces cinq étapes ne sont souvent pas visibles clairement puisqu'elles peuvent avoir lieu en même temps et puisque des interactions intercellulaires peuvent aussi modifier les signaux de fréquence et de dissipation.

J. Wegener⁸⁶ et K. Marx^{64,87} ont montré que la représentation de $\Delta R = f(\Delta F)$ pour le début du processus d'adhésion cellulaire permettait d'obtenir une droite (Figure 9).

⁸⁶ Wegener, J. ; Janshoff, A. ; Galla, H.-J. *Eur. Biophys. J.* **1998**, 28, 26-37.

⁸⁷ Zhou, T. ; Marx, K.A. ; Warren, M. ; Schulze, H. ; Braunhut, S.J. *Biotechnol. Prog.* **2000**, 16, 268-277.

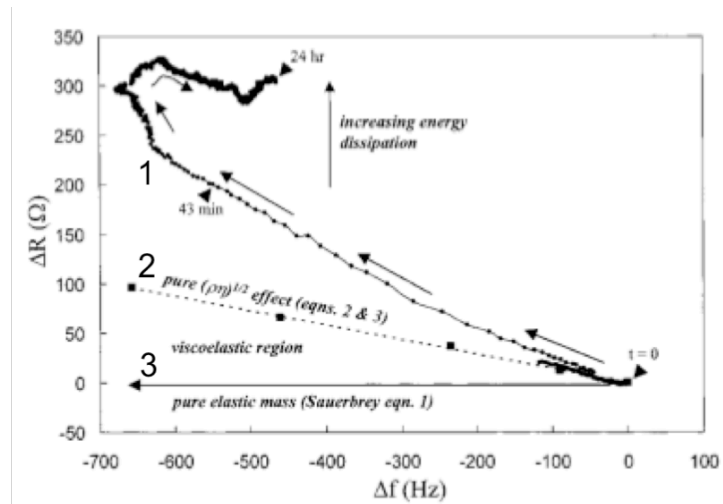


Figure 9 : Représentation de ΔR en fonction de Δf : 1) Pour l'adhésion de cellules sur une surface reconnaissante, 2) Pour une série de solution de concentration croissante en sucre (carré noir) représentant parfaitement un liquide newtonien (ligne en pointillé). 3) Pour une surface fictive qui ne dissipe pas d'énergie ($R = 0$) et peut donc être modélisé avec l'équation de Sauerbrey.⁸⁷

Sur la Figure 9, la courbe 1 représente l'évolution de la résistance (équivalent au facteur de dissipation) en fonction de la fréquence lors du processus d'adhésion de cellules sur une surface reconnaissante. Durant la première heure de contact des cellules avec la surface, cette représentation permet d'obtenir une droite. Les auteurs décrivent alors la couche de cellules ancrées à la surface comme un matériau viscoélastique continu et comparent les variations d'oscillations avec celles obtenues pour un fluide newtonien visqueux (courbe 2). Par analogie avec ce type de fluide, ils calculent alors la viscosité et la densité de la couche de cellules afin de caractériser le processus d'adhésion et d'étalement des cellules. La courbe 3 est le résultat théorique d'une couche qui ne dissiperait pas d'énergie ($R = 0$) et permet, par comparaison avec la courbe 1, de mettre en avant le comportement non rigide de la couche de cellules adhérentes.

Afin de mieux comprendre les paramètres qui déterminent la réponse de la QCM lors de l'adhésion cellulaire, des travaux ont tenté de modéliser le processus d'adhésion cellulaire en utilisant des vésicules lipidiques.⁸³ Ces systèmes ne se sont pas révélés pleinement satisfaisants puisque les liposomes n'ont pas le même comportement que les cellules lorsqu'ils adhèrent à la surface, les variations de dissipation par exemple ne sont pas comparables.

Ces exemples de la littérature montrent que l'analyse de l'adhésion cellulaire par QCM-D est possible même si de nombreux paramètres sont à prendre en compte.

III. Présentation des travaux de thèse

Le but de ce travail est de mettre au point une plateforme d'étude permettant de caractériser l'interaction moléculaire entre des ligands peptidiques et des cellules surexprimant un récepteur transmembranaire, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La technique QCM-D est utilisée dans ce travail pour suivre le processus d'adhésion des cellules HEK293 (β_3) qui surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur une surface présentant le cyclopentapeptide c(-RGDfK-), choisi comme modèle de ligand pour réaliser cette étude.

1. Travaux préliminaires

a. Introduction

Dans les années 90 a été développé un châssis cyclodécapeptidique⁸⁸ de séquence c(-Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-)2. Ces châssis sont inspirés de ceux mis au point par M. Mutter⁸⁹ à la fin des années 1980 alors appelés TASP (Template-Assembled Synthetic Protein) dans le but de mimer les propriétés fonctionnelles des protéines. Les motifs structuraux d'intérêt sont organisés dans l'espace sur le gabarit afin de mimer une partie de la protéine. Dans notre cas, le greffage des différents motifs se fait par les chaînes latérales des lysines qui sont orientées de part et d'autres du plan moyen de la molécule (Schéma 25).

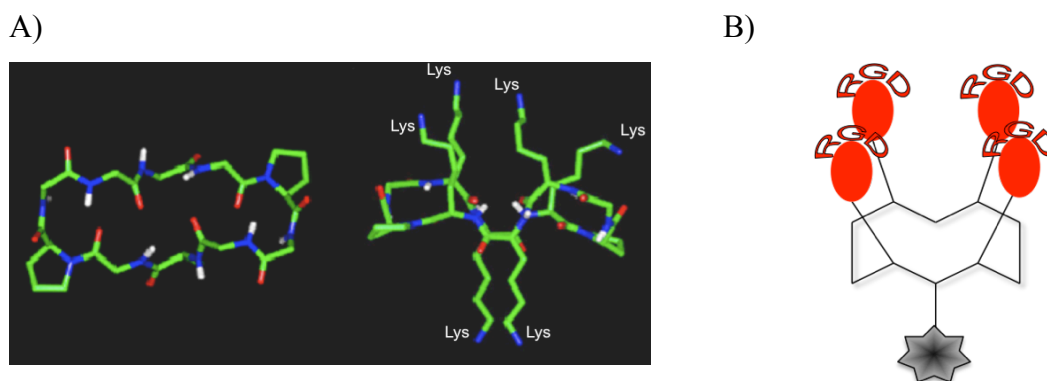


Schéma 25 : A) Modélisation moléculaire du cyclodécapeptide, B) Schéma du châssis moléculaire présentant les deux faces distinctes (en rouge, les ligands -RGD-, en gris, une molécule de détection, une molécule thérapeutique ou un groupement précurseur au greffage sur une surface).

On distingue ainsi une face d'adressage (arbitrairement, la face supérieure) qui peut présenter, de façon multivalente, l'élément de reconnaissance et une face effectrice (arbitrairement, la face inférieure) qui permet de greffer une molécule de détection⁶²,

⁸⁸ Dumy, P. ; Eggleston, I.M. ; Cervigni, S. ; Sila, U. ; Sun, X. ; Mutter, M.A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255-1258.

⁸⁹ Mutter, M. ; Altmann, K.H. ; Tuchscherer, G. ; Vuilleumier, S. *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 771-785.

cytotoxique ou dans notre cas un groupe précurseur à l'ancrage sur une surface. Tous les résidus lysine peuvent être remplacés par des résidus alanine afin de faire varier le nombre de groupes fonctionnels. Ces châssis moléculaires ont abouti au laboratoire à la synthèse de différentes molécules présentant des sucres^{90,91}, des acides nucléiques⁹², de petites molécules⁹³ ou des peptides⁹⁴ permettant ainsi de les tester dans diverses applications.⁹⁵ Dans nos études, la face d'adressage présente un ligand peptidique cyclique de séquence -RGDfK- (- arginine - glycine - acide aspartique - D-phénylalanine - lysine -) qui se lie de façon spécifique à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Lors des tests d'adhésion cellulaire, des contrôles seront effectués avec des vecteurs présentant la séquence -R β ADfK-, l'introduction d'une β -alanine dans la structure permet d'obtenir un peptide n'ayant plus d'affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.⁷

Au laboratoire, de nombreux travaux ont permis de mettre au point puis d'améliorer la synthèse de la molécule cyclodécapeptidique présentant le ligand RGD.^{62,96,97} Afin de montrer l'impact biologique de la multivalence de ce composé, des tests de compétitivité et d'inhibition ont été réalisés sur des composés présentant 1, 2, 3, 4 ou 16 ligands cycliques -RGD-.⁹⁸ C'est le cyclodécapeptide présentant quatre ligands qui s'est révélé le plus efficace. Différents tests biologiques *in vitro* et *in vivo* ont ensuite été effectués permettant de valider la pertinence de ce châssis dans plusieurs applications. Les paragraphes suivants développent quelques résultats obtenus avec ce type de molécule.

b. Utilisation en détection et en thérapie

Le greffage de fluorochrome comme la fluorescéine ou la FITC sur le cyclodécapeptide a permis de montrer que la présentation de quatre ligands -RGD- provoquait l'internalisation des vecteurs dans les cellules.^{62,99} La Figure 10 compare la fluorescence de cellules mises en

⁹⁰ Dulery, V. ; Uhlich, N.A. ; Maillard, N. ; Fluxa, V.S. ; Garcia, J. ; Dumy, P. ; Renaudet, O. ; Raymond, J.L. ; Darbre, T. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4134-4141.

⁹¹ Wilczewski, M. ; Van der Heyden, A. ; Renaudet, O. ; Dumy, P. ; Coche-Guérente, L. ; Labbé, P. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1114-1122.

⁹² Murat, P. ; Cressend, D. ; Spinelli, N. ; Van der Heyden, A. ; Labbé, P. ; Dumy, P. ; Defrancq, E. *Chem. Bio. Chem.* **2008**, *9*, 2588-2591.

⁹³ Dolphin, G.T. ; Chierici, S. ; Ouberaï, M. ; Dumy, P. ; Garcia, J. *Chem. Bio. Chem.* **2008**, *9*, 952-963.

⁹⁴ Boturyn, D. ; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787-2790.

⁹⁵ Boturyn, D. ; Defrancq, E. ; Dolphin, G.T. ; Garcia, J. ; Labbé, P. ; Renaudet, O. ; Dumy, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 224-240.

⁹⁶ Garanger, E. *Thèse de l'Université Joseph Fourier*, **2005**, Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie.

⁹⁷ Foillard, S. *Thèse de l'Université Joseph Fourier*, **2008**, Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anti-cancéreuse et l'imagerie tumorale.

⁹⁸ Garanger, E. ; Boturyn, D. ; Coll, J.L. ; Favrot, M.C. ; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1958-1965.

⁹⁹ Garanger, E. ; Boturyn, D. ; Jin, Z. ; Dumy, P. ; Favrot, M.C. ; Coll, J.L. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 1168-1175.

culture en présence de différentes molécules et permet de montrer l'internalisation du composé cyclodécapeptidique présentant quatre ligands -RGD-.

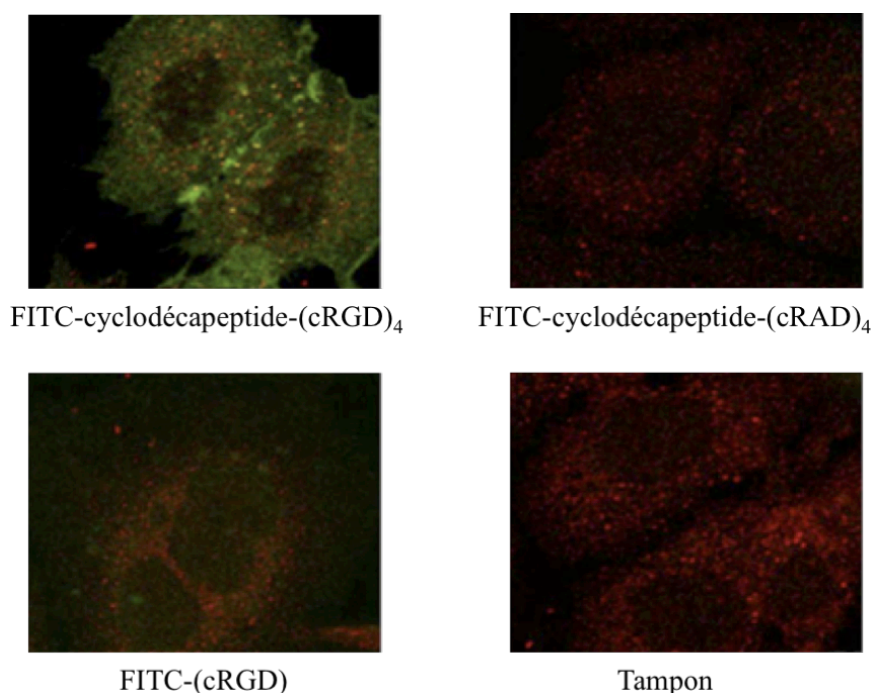


Figure 10 : Les cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont incubées trente minutes à 37°C avec la molécule à tester. Les endosomes sont révélés en fluorescence rouge, la FITC est révélée en fluorescence verte. La colocalisation de la FITC et des endosomes est donc révélée en jaune, uniquement dans le cas du cyclodécapeptide présentant quatre ligands -RGD- révélant ainsi son internalisation.⁹⁹

Le greffage avec la Cyanine 5 a permis de confirmer l'internalisation du vecteur dans les cellules *in vivo*.¹⁰⁰ Les tests sur des souris ont montré une concentration importante et majoritaire de la molécule au niveau des tumeurs induites. Cette molécule (Cy5-cyclodécapeptide-(cRGD)₄) est actuellement en phase de tests cliniques pour l'aide à chirurgie dans les procédures d'ablation tumorale. Les différents résultats d'imagerie ainsi obtenus confirment l'efficacité de ciblage cellulaire du vecteur cyclodécapeptidique.⁹⁹

Par ailleurs, des peptides connus pour provoquer l'apoptose, ont été greffés sur le cyclodécapeptide présentant le ligand -RGD- de façon multivalente. Il a alors été montré que les vecteurs libéraient la drogue dans les cellules induisant ainsi la mort cellulaire.^{101,102} Ces tests, effectués *in vivo* et *in vitro*, montrent la pertinence de l'utilisation du cyclodécapeptide en thérapeutique.

¹⁰⁰ Razkin, J. ; Josserand, V. ; Jin, Z.H. ; Dumy, P. ; Favrot, M.C. ; Coll, J.L. ; Texier, I. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.

¹⁰¹ Foillard, S. ; Jin, Z. ; Garanger, E. ; Boturyn, D. ; Favrot, M.-C. ; Coll, J.-L. ; Dumy, P. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2326-2332.

¹⁰² Foillard, S. ; Sancey, L. ; Coll, J.L. ; Boturyn, D. ; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 221-224.

c. Immobilisation sur des supports solides, étude de l'adhésion cellulaire

Deux approches d'immobilisation des cyclodécapeptides sur des surfaces solides ont déjà été réalisées au laboratoire.

D'une part, la synthèse de ligand -RGD- sur des billes de résine a été réalisée et l'adhésion cellulaire a été évaluée directement sur ce support par microscopie optique.¹⁰³

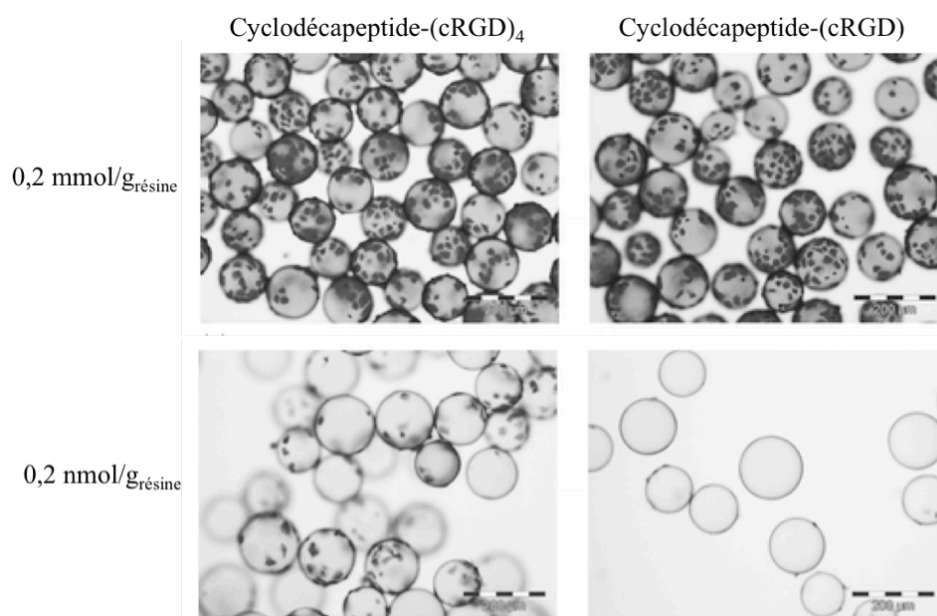


Figure 11 : Tests d'adhésion cellulaire (cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$) sur des billes de résine greffées à différentes densités avec le cyclodécapeptide présentant 1 ou 4 ligands -RGD-.¹⁰³

A 0,2 mmol par gramme de résine (Figure 11, photos supérieures), la quantité de cellules adhérentes sur le cyclodécapeptide présentant un ligand -RGD- est similaire à celle sur le cyclodécapeptide présentant quatre ligands -RGD-. L'effet de multivalence de la molécule est visible à très faible densité de greffage sur la surface (Figure 11, photos inférieures). La problématique de cette approche était l'étude d'un ligand multivalent sur un support multivalent qui a donc nécessité de travailler à faible densité pour visualiser l'effet de multivalence de la molécule. Des tests supplémentaires effectués avec des cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_1$ (non reconnaissante de la séquence -RGD-) montrent que le contrôle de la densité de greffage est également nécessaire pour garantir la sélectivité de l'adhésion cellulaire. En adaptant le ligand, ce système pourrait être utilisé pour détecter différents types cellulaires dans des échantillons biologiques (application en diagnostique par exemple).

¹⁰³ Foillard, S ; Dumy, P. ; Boturyn, D. *Org. Biomol. Chem*, **2009**, 7, 4159-4162.

D'autre part, l'immobilisation sur des surfaces de transducteurs a été envisagée afin d'évaluer les propriétés de reconnaissance de ligands par des techniques physico-chimiques en ayant une surface parfaitement contrôlée. Des études préliminaires en QCM-D ont été réalisées en immobilisant, via des groupements thiol ou disulfure sur la face inférieure, des cyclodécapeptides présentant quatre ligands -RGD-¹⁰⁴ ou quatre ferrocène + quatre ligands -RGD-¹⁰⁵ (Schéma 26).

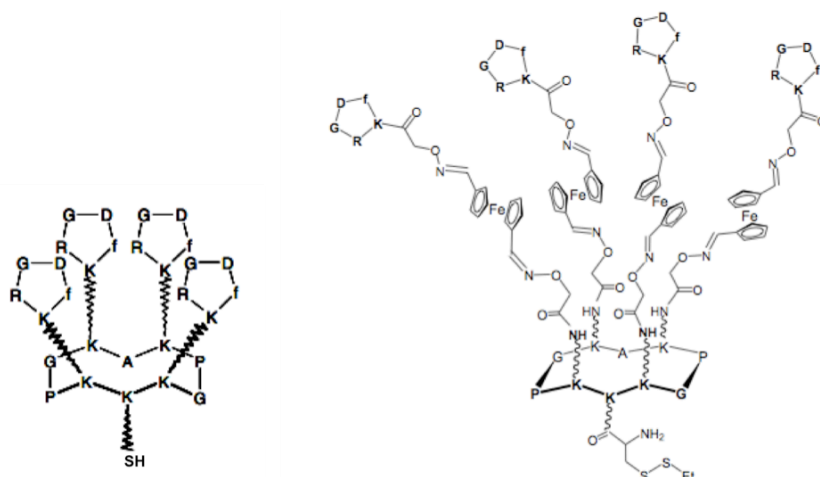


Schéma 26 : Molécules préablement étudiées au laboratoire par des tests d'adhésion cellulaire suivi par QCM-D. Les molécules sont greffées directement sur des surfaces d'or *via* la fonction thiol.

Cette méthode d'immobilisation s'est avérée non adaptée pour l'étude de l'adhésion cellulaire puisque la monocouche formée par les cyclodécapeptides n'est pas assez dense pour empêcher l'adhésion non spécifique des cellules sur l'or.

2. Projet de recherche

Suite aux travaux précédents, nous avons envisagé d'immobiliser les vecteurs présentant quatre motifs -RGD- sur des surfaces de transducteurs et d'étudier l'adhésion cellulaire sur ces surfaces. Les méthodes de greffage envisagées devront permettre de résister à l'adhésion non spécifique des cellules. Différentes méthodes physico-chimiques seront utilisées pour la caractérisation des surfaces fonctionnalisées et pour l'étude des interactions avec les cellules.

Cette molécule, présentant quatre ligands -RGD- a été choisie pour cette étude car le laboratoire a déjà montré qu'elle était plus efficace pour des applications biologiques *in vivo*

¹⁰⁴ Wilczewski, M. Thèse de l'Université Joseph Fourier, **2007**, Les interactions multivalentes : leurs rôles dans les processus de reconnaissance biomoléculaire et leur application dans la construction d'assemblage supramoléculaire.

¹⁰⁵ Devillers, C. Thèse de l'Université Joseph Fourier, **2006**, Récepteurs et matériaux redox-actifs pour l'activation et la signalisation d'interactions moléculaires.

qu'une molécule ne présentant qu'un ligand -RGD-.⁹⁸ Le but était donc ici d'étudier de façon plus approfondie cette molécule multivalente par différentes techniques physico-chimiques présentes au laboratoire. Pour les études d'adhésion cellulaire, la QCM-D a été privilégiée au cours de ce travail car nous avons estimé qu'elle était la méthode la plus facile à mettre en œuvre. De plus en plus de travaux ont été publiés ces dernières années avec cette méthode, ce qui nous a aidé à interpréter les résultats. L'acquisition récente d'un appareil de microscopie optique couplée à la QCM-D nous a permis de confirmer et d'approfondir les résultats d'adhésion cellulaire préalablement obtenus.

Au cours de ce travail de thèse, la synthèse des différents vecteurs cyclodécapeptidiques a été effectuée en introduisant la molécule cyclique -RGD- sur la face supérieure et les différentes fonctions nécessaires à l'ancrage sur la surface (aldéhyde, alcyne, biotine ou lipides) sur la face inférieure. Nous présenterons dans le premier chapitre, les méthodes de synthèse de chacune de ces molécules. Pour l'immobilisation par couplage affiné (impliquant une biotine) une molécule de contrôle présentant la séquence peptidique -RβAD- (arginine - β alanine - acide aspartique) qui n'est pas reconnu par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, a également été synthétisée. Nous décrirons également la synthèse des alcanethiols oxyamine qui ont été préparés à partir d'alcanethiols amine commerciaux.

Après avoir effectué la synthèse des différents ligands, nous les avons immobilisés sur des surfaces. La stratégie utilisée pendant ce travail a consisté à analyser les interactions ligands/récepteurs cellulaires *via* des méthodes de caractérisation physico-chimiques de surface. Les ligands peptidiques -RGD- ont été immobilisés sur la surface d'un transducteur et l'étude des interactions a été réalisée par des tests d'adhésion cellulaire avec des cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Afin de limiter l'adhésion non spécifique des cellules sur les plateformes de greffage, nous avons envisagé de masquer les surfaces par des SAM d'alcanethiols portant des groupements OEG d'une part et par la formation d'une bicouche lipidique présentant la PC d'autre part. Trois méthodes de greffage du cyclodécapeptide sur la surface ont alors été envisagées (Schéma 27) :

- Le greffage par couplage affiné entre biotine et streptavidine (A) (avec une biotine sur la face inférieure du cyclodécapeptide).
- Le dépôt d'une bicouche lipidique formé de POPC (palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine) et de cyclodécapeptide présentant deux chaînes lipidiques sur la face inférieure (B).

- Le greffage par couplage covalent, par cycloaddition 1,3-dipolaire (C) (entre un azoture sur la surface et un alcyne sur la face inférieure du cyclodécapeptide) ou par formation d'un lien oxime (D) (réaction entre une oxyamine sur la surface et un aldéhyde sur la face inférieure du cyclodécapeptide).

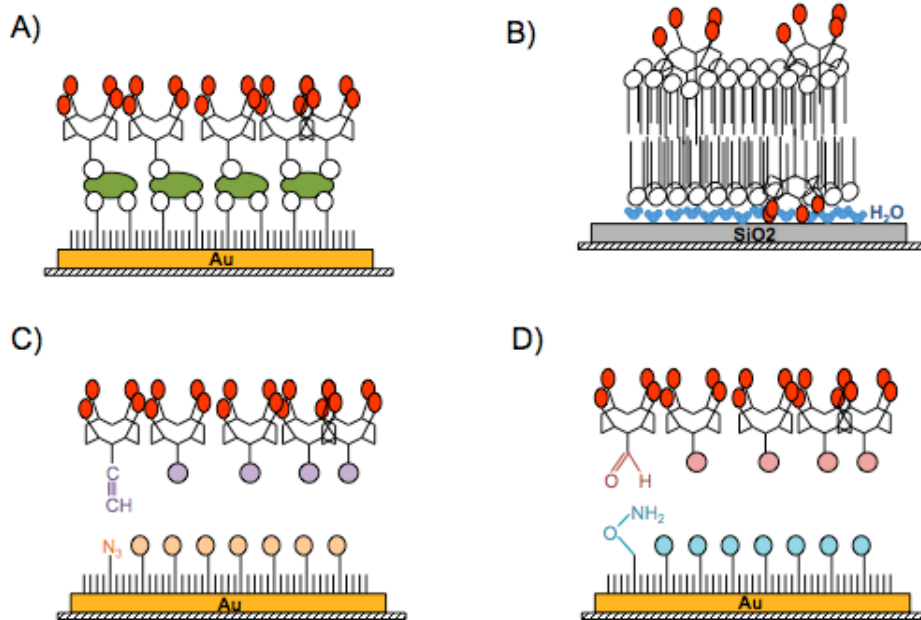


Schéma 27 : Représentation des différents modes de greffage des surfaces utilisés au cours de cette thèse. Le peptide -RGD- est systématiquement présenté en rouge.

La construction des couches a été suivie et caractérisée par QCM-D, ellipsométrie, électrochimie et mesures d'angle de contact ce qui a permis de vérifier la reproductibilité des assemblages. Les études d'adhésion cellulaire ont été suivies par QCM-D et par microscopie optique. Pour chaque expérience, des contrôles avec des cellules non reconnaissantes (ne présentant pas l'intégrine $\alpha_V\beta_3$) ou des surfaces non reconnaissantes (ne présentant pas le motif RGD) ont été effectués.

Chapitre II : Synthèse des macromolécules peptidiques

Chapitre II : Synthèse des macromolécules peptidiques

I. Introduction

Les molécules développées pour les études cellulaires sont construites à partir d'un cyclodécapeptide auquel est associé un ou quatre pentapeptides présentant le motif -RGD- sur la face supérieure et un élément précurseur au greffage sur la face inférieure. Ces biomolécules sont préparées par synthèse mixte sur support solide et en solution. Les peptides linéaires sont assemblés par synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) en utilisant la stratégie Fmoc/*t*Bu. Ils sont ensuite cyclisés en solution et fonctionnalisés pour être assemblés par le biais de liens « oxime » (Figure 12).

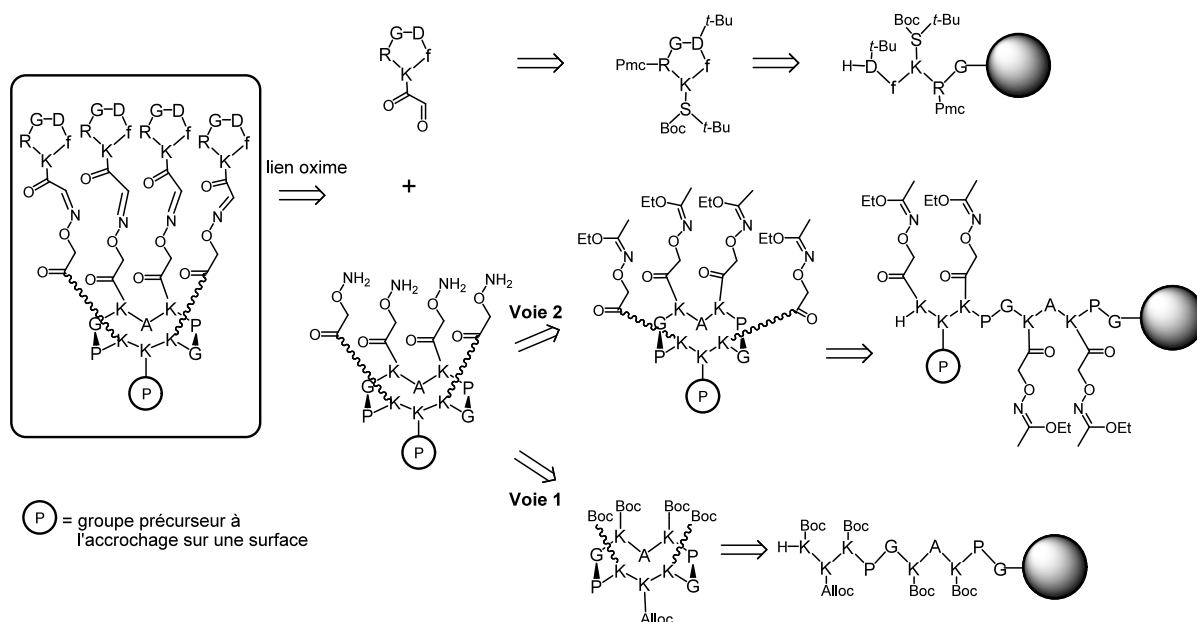


Figure 12 : Schéma rétrosynthétique des molécules présentant 4 ligands -RGD-

Deux stratégies ont été utilisées pour préparer nos peptides : de manière classique en utilisant des Fmoc-AA-OH (voie 1) ou en incorporant au cours de la SPPS des acides aminés préalablement modifiés (voie 2) permettant notamment de réduire le nombre d'étapes de synthèse en solution et de limiter les problèmes de solubilité.

1. La liaison éther d'oxime

La liaison éther d'oxime appartient à la catégorie des ligations chimiosélectives. Ce type de liaison permet l'assemblage convergent de molécules polyfonctionnelles déprotégées de

différentes familles et la construction de conjugués complexes de haut poids moléculaire. Parmi les méthodes de ligations chimiosélectives, la formation de lien oxime s'est avérée particulièrement appropriée pour l'assemblage de molécules peptidiques. En effet, il fait intervenir des fonctions aldéhyde et oxyamine pouvant être facilement introduites par modification des chaînes latérales de certains acides aminés. Par ailleurs, ce lien offre une bonne chimiosélectivité, une flexibilité intéressante et une très bonne stabilité *in vitro* et *in vivo*. En ce qui concerne la synthèse de nos macromolécules peptidiques, les résultats antérieurs ont montré que le lien oxime permet une conjugaison particulièrement efficace des ligands c(-RGDfK-) au gabarit cyclodécapeptidique et ont confirmé la stabilité en conditions physiologiques du vecteur ainsi formé⁹⁶.

Le mécanisme de formation de la liaison éther d'oxime à partir d'un dérivé carbonyle et d'un éther d'oxyamine fait intervenir deux étapes (Figure 13).¹⁰⁶ L'addition du composé nucléophile sur le carbonyle conduit à la formation d'un intermédiaire carbinolamine qui se déshydrate pour donner l'éther d'oxime. Le pH optimum de cette réaction est voisin de 4.

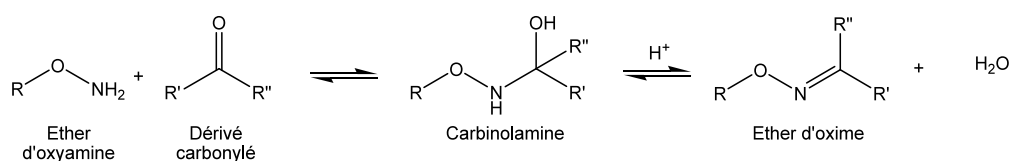


Figure 13 : Mécanisme de formation de la liaison éther d'oxime.

L'obtention de molécules de reconnaissance multivalentes présentant quatre ligands - RGD- résulte de l'assemblage des peptides c[-RGDfK(CO-CHO)-] et des cyclodécapeptides fonctionnalisés avec quatre fonctions oxyamine. Dans cette stratégie de synthèse, le composé carbonyle est un α -oxo aldéhyde, permettant la formation d'une liaison éther d'oxime glyoxylique particulièrement stable et très majoritairement de configuration *E*.⁹⁶

2. La synthèse peptidique sur support solide

Pour préparer les différents peptides linéaires impliqués dans la synthèse de nos composés, nous avons utilisé la technique de synthèse peptidique sur support solide (SPPS). Cette méthode, développée dans les années 1960¹⁰⁷, consiste en l'addition successive d'acides aminés protégés sur un support insoluble à partir de l'extrémité C-terminale. Les supports solides sont des billes de polymères synthétiques présentant des bras espaceurs

¹⁰⁶ Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.

¹⁰⁷ Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

fonctionnalisés pour la liaison avec le premier acide aminé. Il existe aujourd'hui de nombreuses résines commerciales possédant différentes propriétés de solvation (solvants aqueux/organiques) et diverses fonctions chimiques. Le choix de la résine permet la synthèse de peptides protégés ou non après décrochage de la résine et conditionne la nature de l'extrémité C-terminale libérée (acide, amide, hydrazide, ester méthylique, aldéhyde).

En SPPS, l'addition de chaque acide aminé correspond à un cycle de deux étapes : le couplage d'un acide aminé protégé et l'élimination du groupe protecteur *N*α-terminal. Cette méthode présente les avantages de la synthèse sur support adaptée à la construction de peptides : facilité et rapidité de la synthèse grâce aux étapes de lavage du peptide sur le support par simple filtration. Afin de tendre vers des réactions complètes, cette méthode nécessite cependant d'utiliser un large excès molaire d'acides aminés et d'activateurs dans des conditions concentrées.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la stratégie Fmoc/*t*Bu. Le fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) s'élimine dans des conditions basiques en présence de pipéridine. Les protections latérales doivent être stables en milieu basique et se déprotègent en conditions acides, comme le *t*Bu éliminé par un traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA). Il existe de nombreux groupements orthogonaux compatibles avec cette stratégie permettant l'élaboration de molécules complexes. Par ailleurs, la modularité de la SPPS nous permet l'incorporation d'acides aminés modifiés ou de dipeptides.

3. Plan de synthèse

Afin d'effectuer des tests d'adhésion cellulaire sur des surfaces, différentes méthodes de greffage des cyclodécapeptides présentant quatre ligands -RGD- ont été envisagés. Dans un premier temps, le couplage affín, déjà largement étudié^{56,61,108}, a été envisagé : il nécessite la synthèse d'un cyclodécapeptide présentant une biotine sur la face inférieure (**12** Figure 14). Le couplage se fait alors par l'intermédiaire de la streptavidine sur une surface présentant des groupements biotine. Dans un second temps, la formation d'une bicouche lipidique sur une surface a été envisagée permettant ainsi la mobilité des ligands. La synthèse d'un cyclodécapeptide présentant des longues chaînes carbonnées sur la face inférieure (**23** Figure 14) a donc été réalisée. Les molécules de reconnaissance sont alors ancrées dans la bicouche. Enfin, dans un dernier temps, le couplage covalent sur la surface a été envisagé dans le but de

¹⁰⁸ Su, X. ; Wu, Y.J. ; Robelek, R. ; Knoll, W. *Langmuir* **2005**, *21*, 348-353.

déterminer avec précision le taux de greffage du ligand. Le cyclodécapeptide a été synthétisé soit avec une fonction aldéhyde sur la face inférieure (**27** Figure 14) pour un couplage *via* un lien oxime, soit avec une fonction alcyne (**34** Figure 14) pour un couplage de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens.

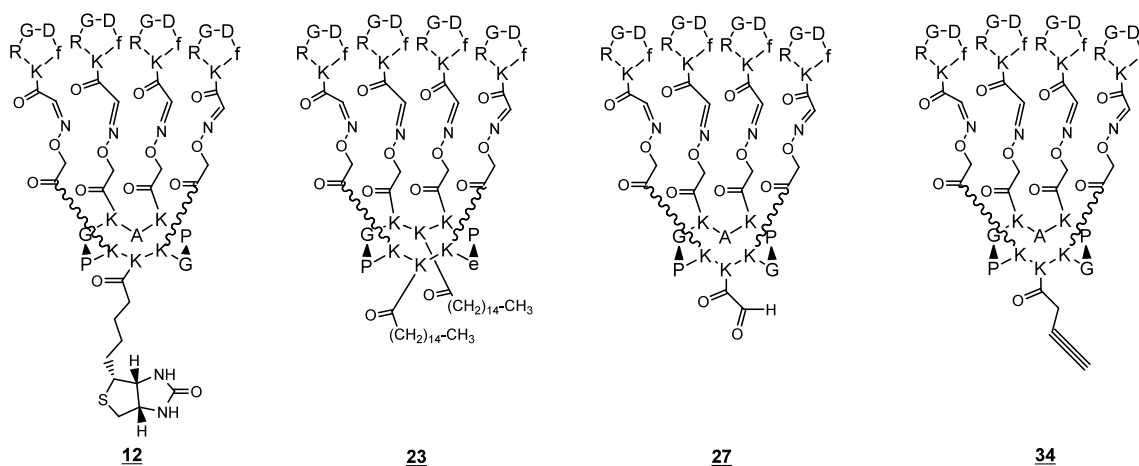


Figure 14 : Présentation des différentes molécules de reconnaissance synthétisées au cours de ce travail

II. Synthèse des cyclopentapeptides présentant le motif -RGD- et de l'analogue -RβAD-

Afin de contrôler la spécificité de nos macromolécules lors des tests d'adhésion cellulaire, nous avons préparé un peptide ne possédant pas d'affinité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ ^{109,110}. La mutation du résidu glycine du cyclopentapeptide par un résidu β -alanine (ajout d'un groupement méthylène dans le squelette amide du motif) permet de diminuer fortement l'affinité vis-à-vis de l'intégrine. La préparation de c[-RGDfK(CO-CHO)-], fonctionnalisé sur le résidu lysine par un aldéhyde glyoxylique, a été décrite précédemment⁹⁴. Les cyclopentapeptides **5** et **6** contenant respectivement les motifs -RGD- et -RβAD- (Figure 15) sont préparés selon des stratégies parfaitement identiques.

¹⁰⁹ Pfaff, M. ; Tangemann, K. ; Müller, B. ; Gurath, M. ; Müller, G. ; Kessler, H. ; Timpl, R. ; Engel, J. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233-20238.

¹¹⁰ Haubner, R. ; Finsinger, D. ; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1374-1389.

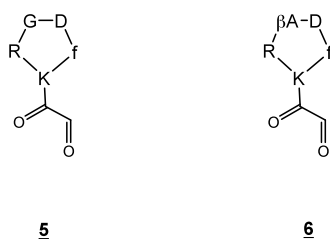
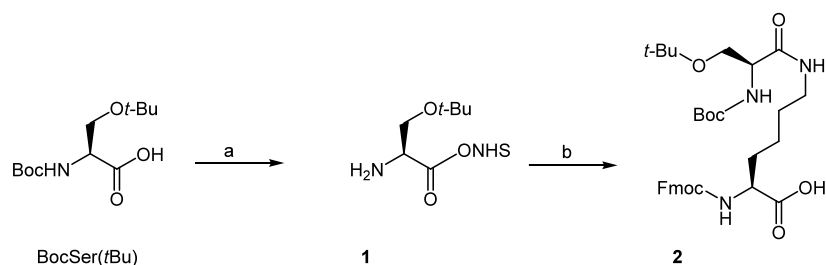


Figure 15 : Schéma des ligands cyclopentapeptidique.

1. Synthèse du dipeptide Lys-Ser, précurseur de la fonction aldéhyde

Afin de limiter le nombre d'étapes, les cyclopentapeptides ont été synthétisés de manière optimisée en incorporant le dipeptide **2** Lys-Ser directement lors de la SPPS. L'introduction de la sérine permet, après oxydation, d'obtenir l'aldéhyde nécessaire à la formation du lien oxime. Différentes méthodes de formation de la fonction aldéhyde sur des acides aminés ont été développées ces dernières années^{111,112}. Nous avons choisi d'introduire la fonction aldéhyde masquée grâce au résidu sérine en l'incorporant sur la chaîne latérale d'un résidu lysine (Figure 16)¹¹³. Le dipeptide **2** est synthétisé à partir d'un résidu lysine et d'un résidu sérine protégé. Il est obtenu en utilisant une méthode classique de formation du lien amide.



Réactifs : a) DCC, NHS, Acétate d'éthyle/dioxane ; b) Fmoc-K-OH, DIPEA, CH₂Cl₂

Figure 16 : Schéma de synthèse du dipeptide portant une fonction aldéhyde masquée¹¹³.

Dans un premier temps, nous préparons, à partir de la BocSer(tBu) l'ester activé **1** en utilisant le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et le *N*-hydroxysuccinimide (NHS). Dans un deuxième temps, l'attaque nucléophile de la fonction amine d'une lysine permet d'obtenir le produit désiré **2** avec une excellente pureté déterminée par RMN et un rendement supérieur à 65%.

¹¹¹ Melnyk, O. ; Fehrentz, J.A. ; Martinez, J. ; Gras-Masse, H. *Biopoly.* **2000**, *55*, 165-186.

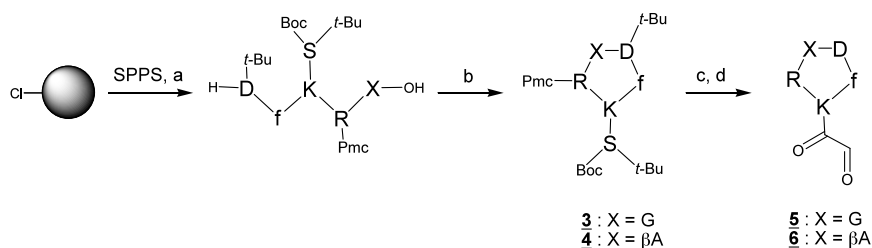
¹¹² Scott, W.L. ; Martynow, J.G. ; Huffinan, J.C. ; O'Donnell, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7077-7088.

¹¹³ Gaertner, H. F. ; Rose, K. ; Cotton, R. ; Timms, D. ; Camble, R. ; Offord, R. E. *Bioconjug Chem* **1992**, *3*, 262-268.

2. Synthèse des cyclopentapeptides

Les cyclopentapeptides présentant la séquence -RXD- ($X = \beta A$ ou G) sont fonctionnalisés avec une fonction aldéhyde masquée introduite grâce à un résidu sérine protégé. La coupure oxydante de la fonction 1,2-aminoéthanol de la sérine par le périodate de sodium produit ensuite un aldéhyde glyoxylique ou α -oxo aldéhyde. L'aldéhyde ainsi formé permet la formation d'une liaison éther d'oxime particulièrement stable.

La voie de synthèse du ligand c[-RXDfK-] a été optimisée en incorporant le dipeptide **2** au cours de la SPPS. Le peptide linéaire est synthétisé sur une résine 2-chlorotrityle compatible avec l'utilisation des groupements protecteurs Pmc, *t*Bu et Alloc (Figure 17). Cette résine présente l'avantage de permettre le décrochement des peptides de la résine dans des conditions très douces (TFA à 1% dans le dichlorométhane) ce qui permet de garder les groupes protecteurs. La synthèse est initiée par une substitution nucléophile d'un atome de chlore par le premier acide aminé en condition basique. Tous les couplages sont réalisés en utilisant le réactif de couplage PyBOP. L'avancement des réactions est contrôlé par des tests colorimétriques au TNBS. Les cycles de déprotection du groupement Fmoc sont effectués avec une solution à 20% de pipéridine dans le DMF libérant l'extrémité *N*-terminale du peptide supporté afin de réaliser le couplage de l'acide aminé suivant. Les solutions récupérées lors des déprotections contenant l'adduit de la pipéridine sur le dibenzofulvène permettent de quantifier de façon indirecte le taux de greffage de l'acide aminé par spectrométrie UV. L'élongation des séquences est initiée à partir des résidus achiraux (glycine ou β -alanine) pour contourner les problèmes d'épimérisation pouvant être rencontrés lors de la cyclisation en solution. Les peptides protégés sont décrochés de la résine dans une solution diluée de TFA (1 %) et ensuite cyclisés en présence de PyBOP dans le DMF en milieu légèrement basique dans des conditions de haute dilution. Les réactions intramoléculaires entre les fonctions acide et amine sont ainsi favorisées au détriment de la formation de dimères ou d'oligomères.



Réactifs : a) 1 % TFA/ CH_2Cl_2 ; b) PyBOP, DIEA, DMF; c) TFA/ H_2O /TIS (95/2,5/2,5) ; d) $NaIO_4$, H_2O

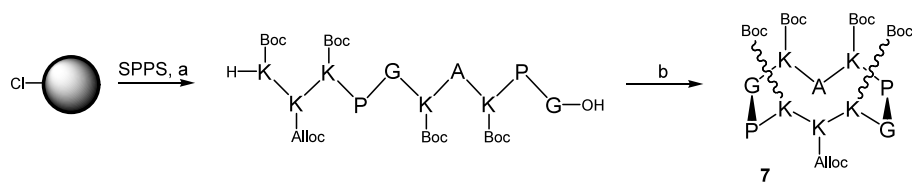
Figure 17 : Schéma de la voie de synthèse optimisée de c[-RXDfK(CO-CHO)-].

Les peptides **3** et **4** ainsi obtenus sont alors déprotégés en milieu acide au moyen d'une solution concentrée de TFA (95 %) en présence d'agents nucléophiles (H₂O/TIS) réduisant les carbocations tertio-butyles libérés. L'oxydation de la fonction 1,2-aminoalcool du résidu sérine est enfin réalisée dans l'eau en présence d'un fort excès de périodate de sodium (10 éq.). La réaction est complète au bout de vingt minutes. Les composés **5** et **6** sont immédiatement purifiés par CLHP afin d'éliminer les sels présents (NaIO₄ et NaIO₃) ainsi que le formaldéhyde libéré lors de la coupure oxydante.

III. Synthèse des cyclodécapeptides biotinylés sur la face inférieure

1. Synthèse du châssis cyclodécapeptidique par la voie classique

Dans le cas des dérivés biotinylés, la molécule a été synthétisée de façon classique selon la procédure décrite précédemment⁶² : les modifications des faces supérieures et inférieures du cyclodécapeptide seront effectuées dans un second temps. Le précurseur linéaire est réalisé sur une résine 2-chlorotriyle en utilisant la stratégie Fmoc/tBu (Figure 18). Les chaînes latérales des acides aminés sont protégées dans ce cas par des groupements *tertio*-butyloxycarbonyle (Boc) ou allyloxycarbonyle (Alloc). La synthèse du peptide commence, là aussi, à partir d'un résidu glycine achiral de façon à s'affranchir des phénomènes d'épimérisation qui peuvent survenir lors de l'étape ultérieure de cyclisation.



Réactifs : a) 1% TFA/CH₂Cl₂ ; b) PyBOP, DIEA, DMF

Figure 18 : Synthèse classique du cyclodécapeptide

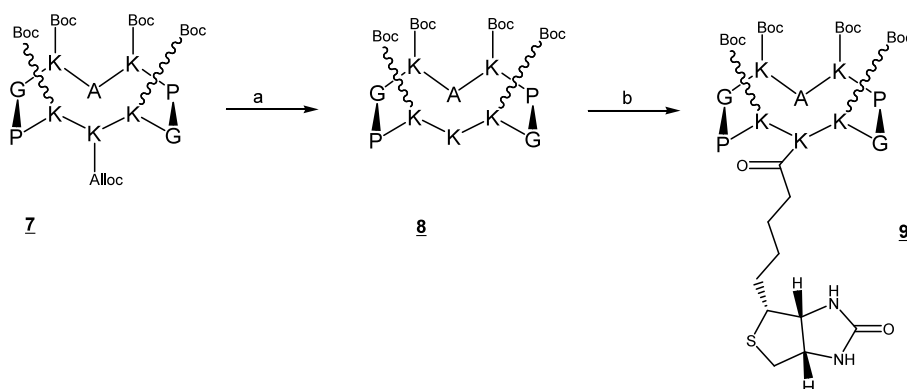
Après le couplage des différents acides aminés et l'élimination du dernier groupement Fmoc, l'obtention du peptide linéaire s'effectue en conditions acides douces (1 % TFA dans le dichlorométhane) permettant de garder les groupements protecteurs Boc (Figure 18). La cyclisation intramoléculaire est effectuée entre les fonctions acide et amine des extrémités du peptide en présence de PyBOP et de DIEA dans des conditions de haute dilution pour obtenir le composé **7** quantitativement.

2. Couplage de la biotine et des peptides RXD sur le cyclodécapeptide

Le composé **7** obtenu précédemment présente des protections orthogonales sur chaque face : la face inférieure est d'abord fonctionnalisée par une biotine puis les ligands cyclopentapeptidiques sont greffés sur la face supérieure.

a. Couplage de la biotine

Le groupement Alloc sur la chaîne latérale du résidu lysine est éliminé par une catalyse au palladium (0) en présence d'un large excès de phénylsilane (PhSiH_3) dans du dichlorométhane anhydre. Le phénylsilane, donneur d'hydrures, est employé pour piéger l'adduit intermédiaire π -allyl-palladium. Cette réaction se déroule en une demi-heure sous atmosphère d'argon. Le peptide brut **8** est récupéré après une précipitation de celui-ci à l'éther éthylique avec une pureté suffisante pour son utilisation ultérieure (Figure 19).



Réactifs : a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, PhSiH_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$; b) Biotine, PyBOP, DIEA, DMF

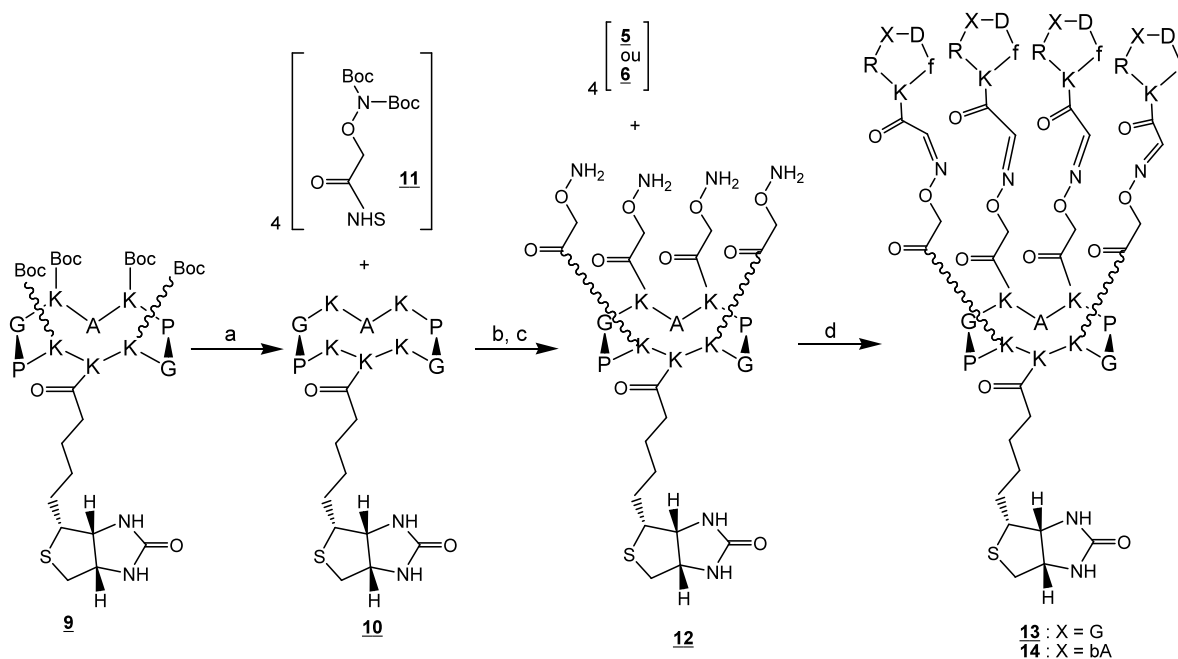
Figure 19 : Couplage de la biotine sur le cyclodécapeptide

La biotine est ensuite couplée sur le cyclodécapeptide par formation d'une liaison amide en milieu légèrement basique en présence de PyBOP dans le DMF pour obtenir le composé **9**.

b. Couplage des ligands -RXD- sur le châssis cyclodécapeptidique biotinylé.

L'élimination simultanée des quatre groupements Boc présents sur les chaînes latérales des lysines du cyclodécapeptide **9** est réalisée au moyen d'une solution de TFA à 50 % dans du dichlorométhane. Ceci permet d'obtenir le composé **10** avec un rendement quantitatif. Ce dernier peptide peut alors être fonctionnalisé sur sa face supérieure avec quatre oxyamines protégées par des groupements Boc. Cette fonctionnalisation est réalisée grâce à une réaction d'acylation des fonctions ϵNH_2 des lysines par l'ester activé **11**.

Les fonctions oxyamine sont ensuite déprotégées en conditions acides en présence d'agents nucléophiles (TIS/H₂O) réducteurs de carbocations. Le peptide **12** est obtenu après purification CLHP.



Réactifs : a) TFA/CH₂Cl₂ (1/1) ; b) DIEA, DMF ; c) TFA/TIS/H₂O/CH₂Cl₂ (50/5/5/40) ; d) H₂O/CH₃CN (1/1)

Figure 20 : Déprotection des fonctions oxyamine du cyclodécapeptide et couplage des c-[RGDFk(CO-CHO)-].

Les précurseurs peptidiques **5**, **6** et **12** étant sous forme de sels de TFA, la réaction de formation des liens éther d'oxime est réalisée dans une solution eau/acétonitrile sans ajout supplémentaire d'acide au milieu réactionnel. La réaction est réalisée en utilisant un léger excès de **5** ou de **6** (1,1 éq./site oxyamine). La réaction est complète au bout d'une heure et les composés sont ensuite purifiés par CLHP afin d'éliminer l'excès de dérivés aldéhyde. Les conjugués **13** et **14** sont obtenus avec une excellente pureté. Ils ont été caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif.

Le rendement de cette voie de synthèse est globalement faible (environ 10%). Ce résultat peut être expliqué, d'une part par la grande réactivité des oxyamines vis-à-vis des carboxyles et d'autre part par la solubilité relativement faible des composés biotinylés. La méthode de purification des peptides, par CLHP, engendre également une diminution des rendements de synthèse.

Ces composés seront utilisés sur des surfaces biotinylées par l'intermédiaire de streptavidine.

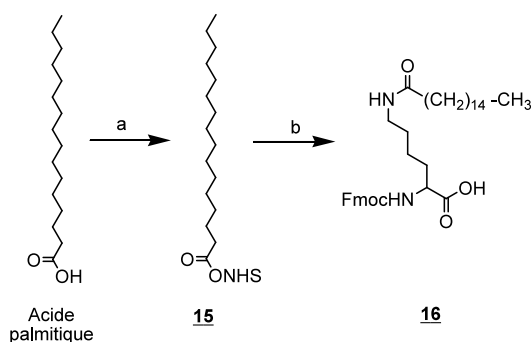
IV. Synthèse du cyclodécapeptide lipidique permettant l'ancrage dans une bicouche.

La présence de résidus d'acides aminés, globalement chargés donc solubles dans l'eau d'une part et de chaînes lipidiques hydrophobes d'autre part pose des problèmes de solubilité. Afin de limiter ces problèmes, de faciliter les purifications et ainsi d'augmenter le rendement global de réaction, nous avons choisi d'introduire les chaînes lipidiques au cours de la SPPS en utilisant des acides aminés préalablement modifiés. Par ailleurs, les fonctions oxyamines nécessaires au couplage avec le ligand -RGD- seront également introduites, sous forme protégée, au cours de la SPPS.

Pour synthétiser la molécule lipopeptidique de reconnaissance nous avons utilisé des acides aminés préalablement modifiés.

1. Synthèse de la lysine substituée par l'acide palmitoïque.

Toujours afin de limiter le nombre d'étapes de synthèse en solution et d'augmenter le rendement global, nous avons décidé d'introduire la chaîne lipidique sur le cyclodécapeptide directement au cours de la SPPS. L'ester *N*-hydroxysuccinimide de l'acide palmitoïque a donc été préparé en présence de DCC dans un mélange acétate d'éthyl/dioxane (1/1). Le composé **15** ainsi formé est caractérisé par RMN. L'attaque nucléophile de l'ester activé **15** sur la fonction amine d'une lysine permet d'obtenir l'acide aminé modifié **16** caractérisé par RMN du proton.



Réactifs : a) DCC, NHS, Acétate d'éthyle/dioxane (1/1) ; b) Fmoc-K-OH, DIEA, CH₂Cl₂

Figure 21 : Synthèse de l'acide aminé modifié Fmoc-Lys-lipide

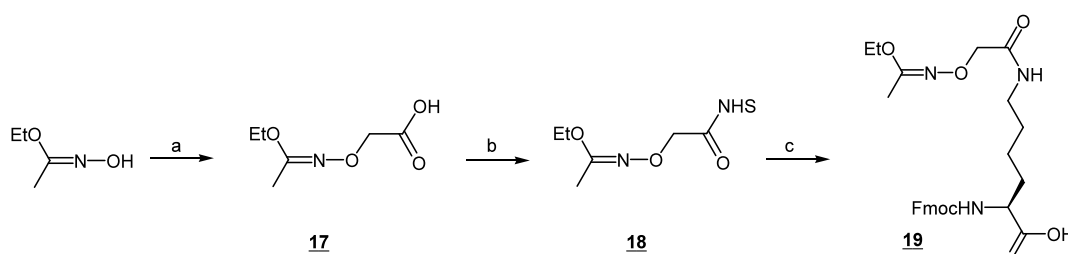
2. Synthèse de la lysine substituée par une oxyamine protégée par le groupement 1-éthoxyéthylidène

La fonction oxyamine est généralement introduite par l'intermédiaire de l'acide 2-aminoxyacétique (Aoa-OH) protégé par un ou deux groupements Boc^{114,115}. La lysine peut

¹¹⁴ Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.

ainsi être fonctionnalisée sur sa chaîne latérale mais l'introduction de cet acide aminé modifié en SPPS s'est révélée inadaptée. En effet, l'azote de la fonction oxyamine reste réactif malgré sa protection lors des réactions de couplage. Cela peut entraîner une N-acylation non désirée et la formation de peptides secondaires au cours des couplages suivants. Afin de pouvoir introduire la fonction oxyamine sur le châssis cyclodécapeptidique au cours de la SPPS, nous avons utilisé un nouveau groupe protecteur de la fonction oxyamine, stable durant la synthèse peptidique et s'éliminant dans des conditions acides douces : le groupement 1-éthoxyéthylidène (Eei)¹¹⁶.

Nous avons donc préparé l'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique, afin de l'introduire sur la chaîne latérale d'un résidu lysine (Figure 22).



Réactifs : a) ICH_2COOH , NaOH , H_2O ; b) DCC , NHS , Acétate d'éthyle/dioxane ; c) Fmoc-K-OH , PyBOP , DIEA , CH_2Cl_2

Figure 22 : Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié présentant la fonction oxyamine protégée par un groupement 1-éthoxyéthylidène.

Le peptide modifié **19** est synthétisé en trois étapes à partir de la Fmoc-Lys-OH et d'un synthon présentant l'oxyamine protégée. La première étape consiste en la préparation de l'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminoxy)acétique à partir de l'éthyle *N*-hydroxyacétimidate et de l'acide iodoacétique en conditions basiques. Dans un deuxième temps, la fonction acide du composé **17** est activée sous forme d'ester *N*-hydroxysuccinimide **18** en présence de DCC. On obtient finalement, après l'acylation de la lysine, l'acide aminé modifié **19**. Ce composé a été caractérisé par RMN du proton.

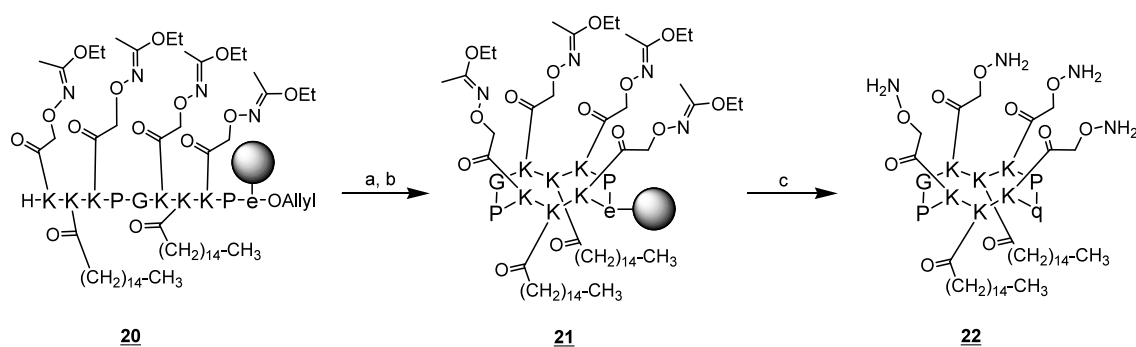
3. Synthèse du cyclodécapeptide lipidique

Le cyclodécapeptide a été synthétisé et cyclisé sur support. En effet, la présence des chaînes lipidiques hydrophobes sur le peptide pose des problèmes de solubilité. Nous avons donc cherché à minimiser le nombre d'étapes en solution.

¹¹⁵ Brask, J. ; Jensen, K.J. *J. Peptide Sci.* **2000**, 6, 290-299.

¹¹⁶ Foillard, S. ; Ohsten Rasmussen, M. ; Razkin, J. ; Boturyn, D. ; Dumy, P. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 983-991.

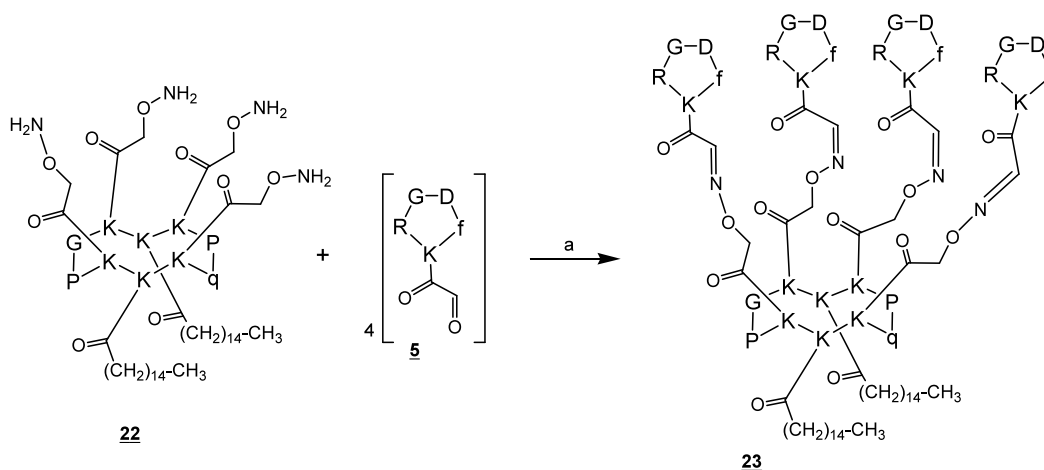
Le lipopeptide **20** est synthétisé sur résine Rink-amide en utilisant la stratégie Fmoc/*t*Bu. La synthèse du peptide est initiée à partir de l'acide glutamique de configuration D : l'acide aminé est greffé sur le support *via* sa chaîne latérale et la fonction acide α de ce dernier, protégé durant la synthèse par un groupement allyle, permet la cyclisation. La configuration D permet de former le coude β dans le peptide final et facilite donc la cyclisation. Les acides aminés modifiés **16** et **19** sont introduits au cours de la SPPS (Figure 23). Après l'élongation du peptide et l'élimination du dernier groupement Fmoc, le groupement allyle est éliminé par une catalyse au Pd(0). La cyclisation se fait en milieu basique en utilisant le PyAOP comme agent activateur afin d'obtenir le peptide cyclique **21**. Le traitement de la résine en milieu acide en présence de piègeurs de carbocations (TIS/H₂O) permet de décrocher le peptide du support et de déprotéger les fonctions oxyamine de la face supérieure du composé **21** en une seule étape.



Réactifs : a) $PhSiH_3$, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2 ; b) PyAOP, DIEA, DMF ; c) TFA/H₂O/TIS (90/5/5)

Figure 23 : Synthèse du lipopeptide oxyamine

Le couplage du lipopeptide **25** avec quatre molécules c[-RGDFK(CO-CHO)-] **5** se fait en milieu acide acétique/H₂O/CH₃CN (50/25/25) pendant 5 heures. Le lipopeptide **23** (Figure 24) est obtenu après purification par CLHP avec un rendement de 5%.



Réactifs : a) Acide acétique/H₂O/CH₃CN

Figure 24 : Synthèse du lipopeptide présentant 4 ligands -RGD-

Ce très faible pourcentage est dû à l'étape de purification qui est rendu difficile par le caractère hydrophile d'une part et hydrophobe d'autre part de la molécule.

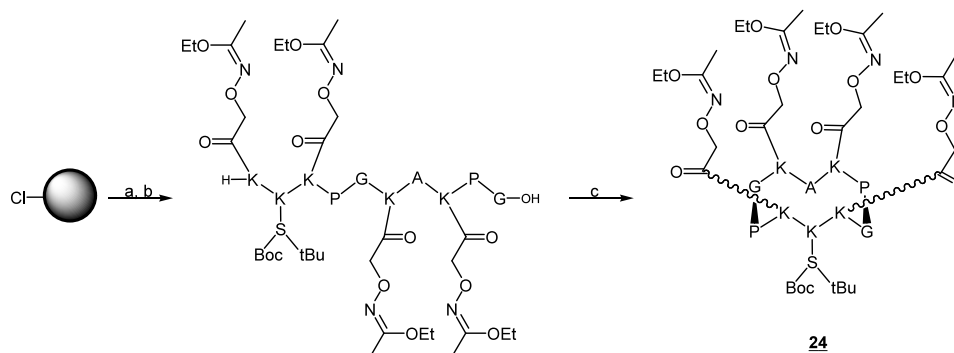
Ce lipopeptide sera inclus dans des vésicules permettant ainsi la fonctionnalisation de surface de SiO₂ par la formation de bicouche lipidique.

V. Synthèse de cyclodécapeptides permettant un ancrage covalent sur les surfaces

Comme dans le cas des lipopeptides, afin de limiter le nombre d'étapes, des acides aminés modifiés seront introduits au cours de la SPPS : une lysine portant l'oxyamine protégée **19** ainsi que le dipeptide Lys-Ser **2**, précurseur de l'aldéhyde ou une lysine modifiée par une fonction alcyne.

1. Synthèse des molécules de reconnaissance présentant une fonction aldéhyde

a. Synthèse du cyclodécapeptide



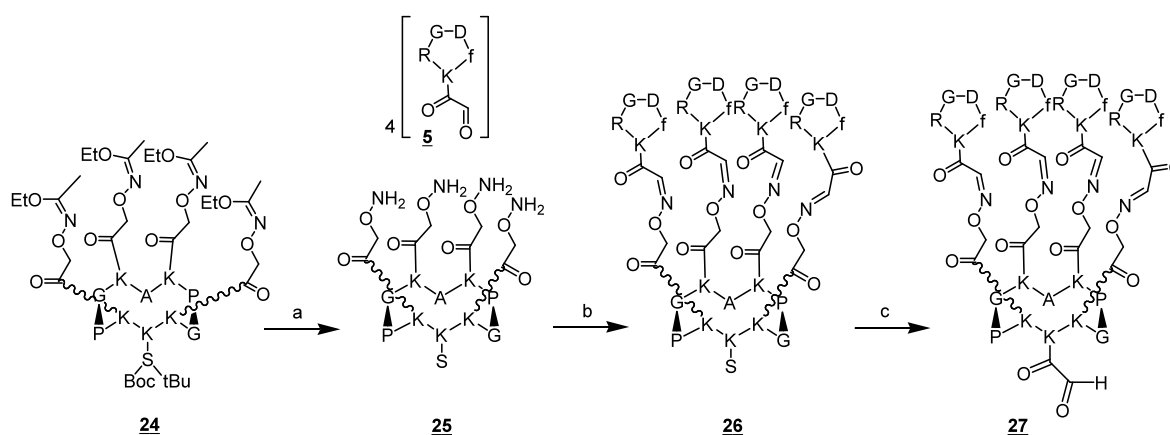
Réactifs : a) SPPS ; b) TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (1/1/8) ; c) PyBOP, DIEA, DMF

Figure 25 : Synthèse optimisée du cyclodécapeptide protégé **24**.

Le composé **24** a été synthétisé en utilisant des acides aminés modifiés. Les composés **2** et **19** ont été incorporés lors de la SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu en utilisant les mêmes conditions de couplage et de déprotection que celles utilisées pour les acides aminés classiques sur une résine 2-chlorotriptyle. Afin de conserver les groupements 1-éthoxyéthylidène sur les fonctions oxyamines, le peptide est décroché de la résine dans des conditions douces TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (1/1/8) (Figure 25). La cyclisation se fait ensuite en solution dans les mêmes conditions que décrites précédemment.

b. Couplage des ligands -RGD- puis formation de la fonction aldéhyde

Le peptide **24** est déprotégé en milieu acide au moyen d'une solution concentrée de TFA (90%) en présence d'agents nucléophiles (H₂O/TIS) piégeant les carbocations tertibutyles libérés. Le couplage du peptide -RGD- **5** est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment afin d'obtenir le composé **26**. L'oxydation de la fonction 1,2-aminoalcool du résidu sérine est enfin réalisée dans l'eau en présence d'un excès de périodate de sodium. Le composé **27** est immédiatement purifié par CLHP et caractérisé par spectrométrie de masse électrospray (Figure 26).



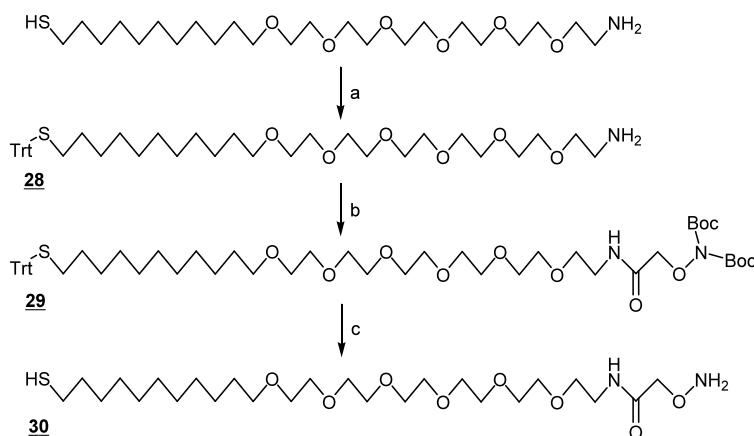
Réactifs : a) TFA/TIS/H₂O (90/5/5) ; b) H₂O/CH₃CN ; c) NaIO₄, H₂O

Figure 26 : Synthèse du composé **27**.

Ce composé sera greffé sur des surfaces fonctionnalisées par des fonctions oxyamine.

c. Thiol-PEG-ONH₂

Afin de greffer les cyclodécapeptides **27** présentant une fonction aldéhyde sur les surfaces nous avons synthétisé le thiol présentant une fonction oxyamine directement au laboratoire. La synthèse se fait en trois étapes à partir du produit commercial HS-C₁₁-(OEG)₆-NH₂ (Figure 27).



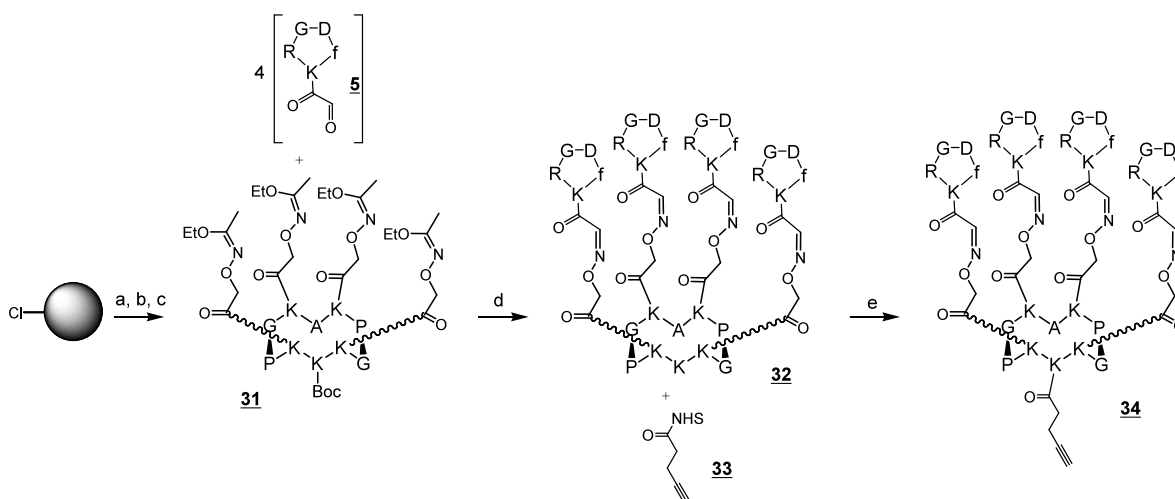
Réactifs : a) Cl-Trt, TFA/DMF (1/9) ; b) ester activé **11**, DIEA, DMF ; c) TFA/TIS/H₂O (1/1/1)

Figure 27 : Synthèse du thiol-oxyamine

La fonction thiol est tout d'abord protégée par un groupement trityl en milieu acide dans le CH₂Cl₂. Le produit est utilisé sans purification après élimination du maximum de TFA. L'oxyamine protégée par deux groupements Boc est ensuite introduite en milieu basique en faisant réagir l'ester activé **11** sur l'amine du composé **28**. Le produit **29** est ensuite purifié par CLHP. La déprotection totale des fonctions thiol et oxyamine se fait en milieu TFA/H₂O/TIS (1/1/1) et le produit final **30** est purifié sur colonne de silice en phase inverse et caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif.

2. Synthèse des molécules de reconnaissance présentant une fonction alcyne

Ce composé a été synthétisé au laboratoire en utilisant des acides aminés modifiés. Le cyclodécapeptide a été assemblé sur support en introduisant la lysine préalablement modifiée **19**.



Réactifs : a) SPPS ; b) TFE, AcOH, CH₂Cl₂ ; c) PyBOP, DIEA, DMF ; d) TFA, H₂O ; e) DMF, DIEA.

Figure 28 : Synthèse du cyclodécapeptide **34** présentant quatre ligands -RGD- et une fonction alcyne.

Le décrochage du peptide de la résine est effectué en condition acide douce TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/1/7). Le cyclodécapeptide cyclique **31** est alors obtenu en solution dans les conditions classiques précédemment décrites. La déprotection des fonctions éthoxyéthylidène et de la fonction Boc est ensuite réalisée en une seule étape avec le couplage des ligands RGD **5** en milieu TFA/H₂O (9/1) pour obtenir le composé **32**. L'introduction de la fonction alcyne se fait ensuite par réaction entre la fonction amine de la lysine et l'ester activé **33** de l'acide 4-pentynoïque, permettant ainsi d'obtenir le cyclodécapeptide **34** présentant quatre peptides -RGD- sur la face supérieure et une fonction alcyne sur la face inférieure. Ce composé sera greffé par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens sur une surface présentant des fonctions azoture.

VI. Conclusion du chapitre

Au cours de ce chapitre, nous avons synthétisé différentes molécules de reconnaissance permettant de tester différentes méthodes de greffage sur des surfaces de transducteurs dans le but d'optimiser les tests d'adhésion cellulaire. Différentes méthodes de synthèse ont été utilisées. Le composé biotinylé a été synthétisé en introduisant au fur et à mesure les molécules fonctionnelles (biotine d'une part, cyclopentapeptide d'autre part). Cette méthode implique de nombreuses étapes de synthèse et donc de purification avec des composés n'ayant pas une très bonne solubilité dans les solvants utilisés. Les autres composés peptidiques ont été synthétisés en introduisant des dipeptides ou des acides aminés modifiés

au cours de la SPPS. Cette méthode a permis de diminuer le nombre d'étapes de synthèse en solution, de limiter les problèmes de solubilité et donc, en général, d'augmenter les rendements globaux. Le composé présentant des chaînes lipidiques présente cependant un rendement faible dû notamment à la dernière étape de purification par CLHP forcément nécessaire. La mise au point d'une extraction liquide/liquide pourrait être envisagée. La technique d'introduction d'acides aminés modifiés pourrait également être appliquée aux composés biotinylés afin d'augmenter le rendement global de synthèse. La biotine serait introduite préalablement sur la chaîne latérale d'une lysine et ce composé serait alors utilisé en SPPS diminuant alors le nombre d'étape en solution.

Chapitre III : Caractérisations physico-chimiques des surfaces biofonctionnalisées et évaluation de leurs propriétés de reconnaissance par des tests d'adhésion cellulaire

Chapitre III : Caractérisations physico-chimiques des surfaces biofonctionnalisées et évaluation de leurs propriétés de reconnaissance par des tests d'adhésion cellulaire

I. Introduction

L'élaboration de surfaces biofonctionnalisées nécessite de contrôler au mieux les différents paramètres d'immobilisation des ligands sur les surfaces (structure moléculaire de la couche, distribution spatiale, densité de greffage et orientation des ligands sur la surface). Les méthodes de fonctionnalisation envisagées doivent permettre de limiter l'adhésion non-spécifique des cellules sur la surface solide et de faciliter l'interaction entre les ligands immobilisés et les cellules. Le choix de la méthode d'immobilisation se fera bien sûr aussi en fonction des facilités de mise en œuvre de celle-ci.

Afin de limiter l'adhésion non-spécifique des cellules, deux approches différentes ont été mises en œuvre au cours de ce travail : la modification de surfaces d'or par une couche d'oligo(éthylène glycol) (OEG) liée de façon covalente à une monocouche d'alcanethiol et la modification d'une surface de silice par une bicouche lipidique supportée de palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC). Les mécanismes de répulsion de ces méthodes ont été développés dans le premier chapitre de ce manuscrit. Les techniques de fonctionnalisation envisagées dépendent alors du substrat, lui-même choisi en fonction de la technique de caractérisation qui sera mise en œuvre. Le couplage affiné streptavidine/biotine d'une part et le couplage covalent d'autre part ont été évalués pour fixer la molécule de reconnaissance sur les monocouches d'alcanethiols. Par ailleurs, l'utilisation de peptides lipidiques a permis d'incorporer les ligands dans les bicouches lipidiques. Chaque type de surface fonctionnelle est dans un premier temps caractérisé par des méthodes physico-chimiques de caractérisation de surface et d'interface avant de réaliser les tests d'adhésion cellulaire suivis par QCM-D et par microscopie optique. Au cours de ces travaux, nous avons tenté d'établir une corrélation entre les variations de fréquence et de dissipation et la morphologie des cellules sur les surfaces en couplant les mesures de QCM-D à la microscopie optique. Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre de ce manuscrit (dans la partie consacré à l'application de la QCM à la caractérisation de l'adhésion cellulaire) les cellules vivantes adhérant sur un quartz piézoélectrique ne se comportent pas comme une couche organique solide. Il est ainsi impossible de corréler les signaux de QCM à la masse de cellules ayant adhérées à la surface. Par ailleurs, les caractéristiques des échantillons, notamment la densité d'intégrine en surface

des cellules ou le nombre de cellules en suspension et donc le nombre de cellules injectées dans la chambre de mesure, sont difficilement reproductibles. Cela rend difficile la comparaison des signaux de QCM d'une expérience à l'autre. Les interprétations des signaux et leur fiabilité sont devenues possibles grâce à l'acquisition en juillet 2008 d'un système multicanal (Modèle E-4 de la société Q-Sense) qui permet de suivre simultanément le comportement de quatre surfaces. Il a ainsi été possible d'une part d'évaluer l'adhésion et l'étalement de cellules d'une même lignée sur des surfaces différentes ou des cellules de lignée différente sur des surfaces identiques. Les résultats obtenus avec les différents modes d'immobilisation des ligands sont présentés successivement dans les paragraphes qui suivent.

II. Couplage affín via le complexe streptavidine/biotine

La première approche concerne l'immobilisation des ligands peptidiques **12** par couplage affín entre la biotine et la streptavidine. Ce mode de couplage permet de s'affranchir des réactions chimiques qui pourraient être complexes sur une surface. Il a déjà été utilisé dans de nombreuses applications pour immobiliser des biomolécules sur des surfaces¹¹⁷ dont quelques exemples ont été développés dans le Chapitre I de ce manuscrit. Au laboratoire des tests d'adhésion cellulaire ont été réalisés grâce à un système analogue avec de bons résultats⁶². Dans cette étude, des plaques de culture à 96 puits étaient recouvertes de streptavidine et fonctionnalisées par différents ligands -RGD- biotinylés à tester. Pour rappel, la streptavidine est une protéine tétramérique capable de fixer quatre molécules de biotine avec une forte affinité. L'immobilisation de la streptavidine à la surface d'une monocouche mixte biotinylée permet d'envisager un contrôle de la densité de greffage en modulant la fraction molaire d'alcanethiols biotinylés sur la surface. De plus, ce mode de couplage doit faciliter son accessibilité pour la fixation du ligand et permettre une présentation des ligands vers la solution. Le Schéma 28 présente les différentes étapes de la construction de l'assemblage biomoléculaire.

¹¹⁷ Wilchek, M. ; Bayer, E.A. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 1-4.

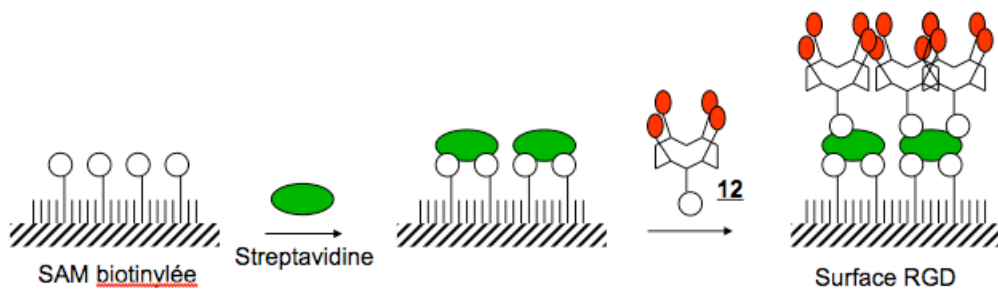


Schéma 28 : Schéma de la construction de la couche reconnaissante

Pour ce mode d'immobilisation, une surface d'or est greffée par une monocouche mixte d'alcanethiols fonctionnalisés par des groupements éthylène glycol dont un pourcentage variable présente un groupement biotine terminal (Schéma 29). La streptavidine est ensuite immobilisée sur la surface biotinylée avant de fixer le cyclodécapeptide **12** présentant les ligands -RGD- (Schéma 29).

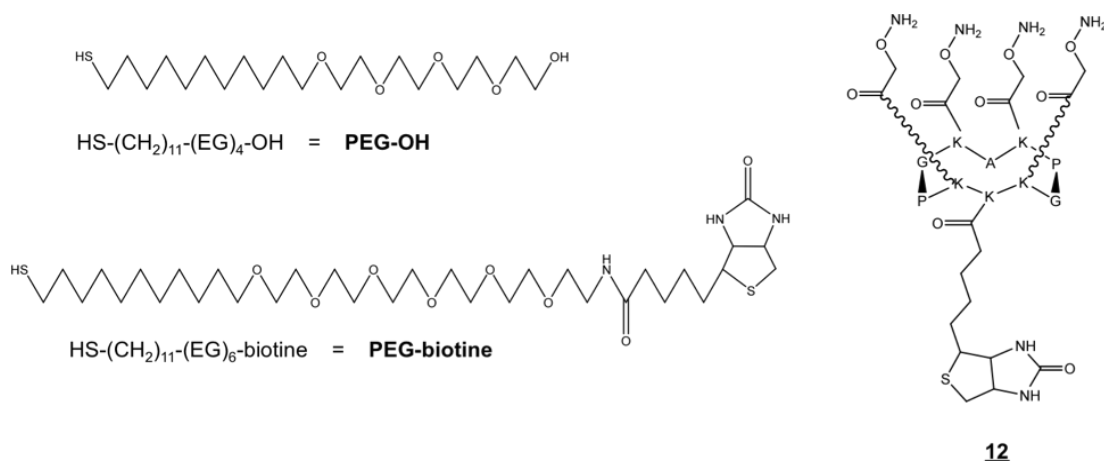


Schéma 29 : Structures des alcanethiols et du cyclodécapeptide **12** présentant les ligands -RGD- utilisés au cours de ce travail.

Une surface fonctionnalisée avec l'assemblage biomoléculaire présentant le ligand **12** sera nommée « surface RGD » dans la suite de ce manuscrit. Lors des études d'adhésion cellulaire, des contrôles ont été effectués avec l'assemblage moléculaire présentant alors le cyclodécapeptide **13** avec la séquence -RβAD- qui ne reconnaît pas l'intégrine α_vβ₃, nommée « surface RAD ».

La caractérisation de l'assemblage biomoléculaire a été réalisée par des techniques physico-chimiques de caractérisation de surface complémentaires comme la QCM-D, l'électrochimie, l'ellipsométrie et les mesures d'angle de contact, permettant ainsi de déterminer sa structure et d'évaluer la densité de greffage en ligand sur la surface. Les tests

d'adhésion cellulaire ont ensuite été effectués et suivis par QCM-D et par microscopie optique.

1. Caractérisation de la couche biomoléculaire

a. Formation et caractérisation de la SAM

Les SAMs mises en œuvre dans cette étude sont formées à partir d'un mélange d'alcanethiols commerciaux PEG-OH et PEG-biotine à différentes fractions molaires pour une concentration totale en solution de 1 mM dans l'éthanol. Les SAMs mixtes sont nommées dans la suite de ce document par le pourcentage de PEG-biotine dans le mélange utilisé pour construire la SAM.

Compte tenue de la similarité de structure des deux alcanethiols (*Cf.* Schéma 29), nous avons fait l'hypothèse dans cette étude, de la formation d'une monocouche homogène sans ségrégation de phase, avec une distribution statistique des groupes biotinylés sur la surface. Nous considérons que les densités de greffage en PEG-biotine sur la surface reflètent la composition en solution, la fraction molaire en PEG-biotine sur la surface correspond donc à sa fraction molaire en solution. En effet, les forces d'interactions moléculaires responsables de l'auto-assemblage d'alcanethiols en monocouche (force de Van-der-Waals entre les chaînes alkyles et liaisons hydrogène entre les groupements éthylène glycol) ne favorisent ni la ségrégation de phase, ni une distribution hétérogène des deux thiols sur la surface dans le cas du mélange PEG-OH et PEG-biotine. De ce fait, le groupement biotinamide qui émerge au-dessus de la SAM vers la solution n'aurait que peu d'influence sur la structure de la SAM. Ces hypothèses s'appuient sur les données de la littérature mais elles sont renforcées par les caractérisations physico-chimiques de la plateforme Au/SAM qui seront présentées dans ce chapitre. Les exemples de la littérature montrent que les mélanges d'alcanethiols avec différentes longueurs de chaîne forment des SAMs mixtes dont la composition est enrichie en alcanethiols de plus longue chaîne.¹¹⁸ Dans notre cas, les deux chaînes alcanes ont onze atomes de carbone. L'homogénéité de la composition locale d'une SAM formé par le mélange d'alcanethiol a suscité une attention particulière, en effet, on peut observer une ségrégation de phase dans le cas où les deux constituants ont des structures très différentes. La formation de domaine observée dans certains cas peut aussi être due à la formation de liaisons hydrogène entre les espèces de même nature. Ainsi Jiang a démontré que ce phénomène était plus

¹¹⁸ Nuzzo, R.G. ; Whitesides, G. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.

marqué lorsque la différence de longueurs de chaîne était supérieure à 4 carbones.¹¹⁹ Il a été reporté des exemples où une SAM mixte contenant un thiol biotinylé ne reflète pas la composition du mélange d'alcanethiol en solution. Dans ce cas, la caractérisation de la SAM a montré que la fraction molaire du thiol biotinylé était alors plus importante sur la surface qu'en solution.^{56,120} D'après les auteurs, cette différence de composition du mélange entre la solution et la surface est due à une différence de solubilité et donc de vitesse d'adsorption sur la surface. Cependant, les thiols biotinylés utilisés dans ces études comportent des liaisons amides de part et d'autre des OEG qui peuvent alors former des liaisons hydrogènes intermoléculaires et ainsi favoriser leur adsorption par la formation de domaines où s'auto-assemblent ces molécules.

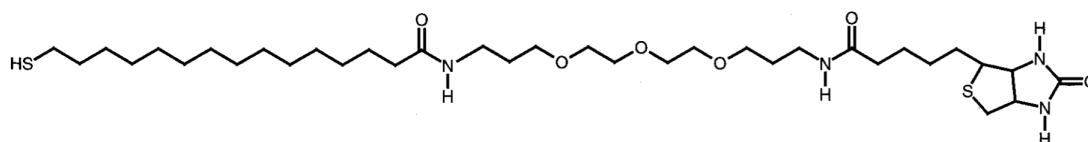


Schéma 30 : Formule développée des alcanethiols biotinylés utilisés dans les études de P. Stayton⁵⁶ et C. Campbell¹²⁰. Le composé PEG-OH utilisé pour former les SAMs mixtes est identique à celui utilisé dans nos études.

Afin de connaître l'organisation structurale de la SAM, plusieurs méthodes de caractérisations physico-chimiques sont utilisées. Le suivi de l'adsorption de la monocouche d'alcanethiols sur des surfaces d'or est réalisé par QCM-D. Cette étude permet de visualiser la cinétique de formation de la monocouche et de déterminer la masse surfacique de la couche d'alcanethiols greffés. Des expériences électrochimiques de désorption réductrice sont effectuées sur les surfaces fonctionnalisées afin de déterminer la concentration surfacique molaire en alcanethiols et de la comparer à la masse surfacique obtenue par QCM-D. La détermination de la capacité de double couche par électrochimie, caractéristique de cette interface, nous renseigne sur la compacité de la couche. Enfin, la perméabilité de la SAM est testée par l'étude de la réponse électrochimique d'une sonde redox en solution. Cette mesure permet en effet d'estimer le pourcentage de recouvrement de la surface par la SAM et de quantifier la présence de défauts.¹²¹

¹¹⁹ Chen, S. ; Li, L. ; Boozer, C.L. ; Jiang, S. *Langmuir* **2000**, *16*, 9287-9293.

¹²⁰ Jung, L.S. ; Nelson, K.E. ; Stayton, P.S. ; Campbell, C.T. *Langmuir* **2000**, *16*, 9421-9432.

¹²¹ Mokrani, C. ; Fatisson, J. ; Guérente, L. ; Labbé, P. *Langmuir* **2005**, *21*, 4400-4409.

i. Mesures par QCM-D

L'adsorption des thiols a été suivie par QCM-D en mode « statique » c'est à dire que la solution de thiol est injectée rapidement sur la surface et maintenue ainsi, sans mouvement pendant tout le temps de l'expérience, en contact avec la surface d'or. Les expériences ont été effectuées pour une solution de PEG-OH ou de PEG-biotine dans l'éthanol. La Figure 29 présente le profil de QCM-D caractéristique de l'adsorption de PEG-OH sur la surface d'or.

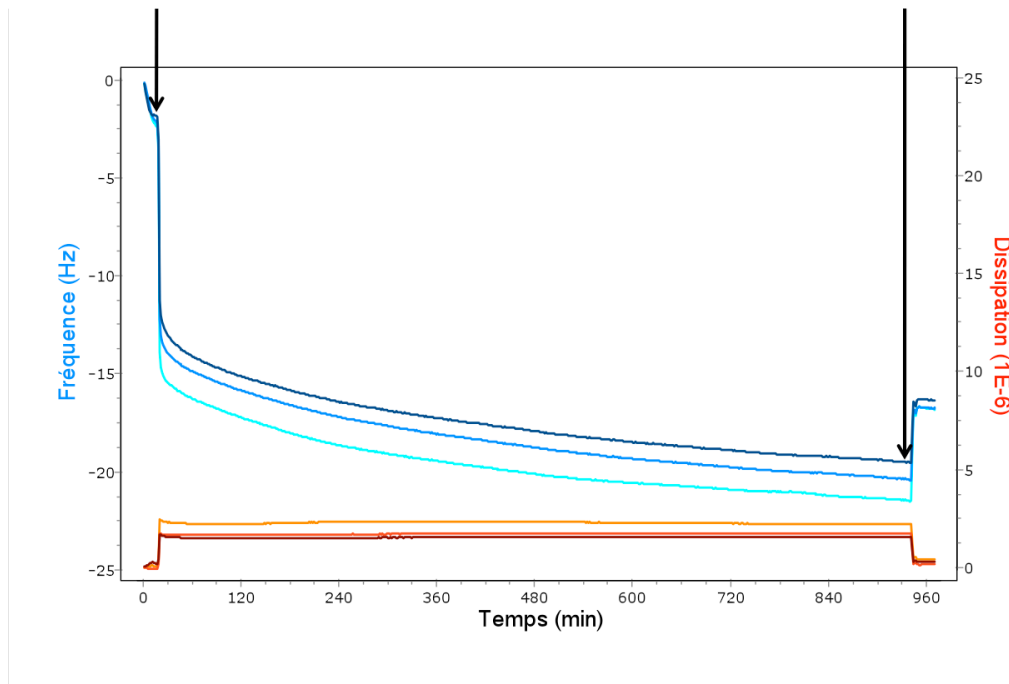


Figure 29 : Variations de fréquence (en bleu) et de dissipation (en rouge) obtenues pour l'adsorption du PEG-OH suivi par QCM-D. Les flèches correspondent respectivement à l'injection de la solution de thiol et au rinçage à l'éthanol. Les 3^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} harmoniques sont représentées de la moins foncée à la plus foncée.

On remarque sur la Figure 29 que l'obtention d'un signal stable n'est pas observée avant l'injection du thiol. En effet, l'or nu, qui a subi un prétraitement à l'ozone suivi d'un rinçage à l'éthanol, est très réactif ce qui conduit à l'adsorption d'impuretés présentes dans l'éthanol. Ce phénomène induit une diminution continue de la fréquence (qui traduit une augmentation de la masse du quartz). L'injection de la solution de PEG-OH ou de PEG-biotine dans la chambre de mesure (1^{ère} flèche) provoque une diminution rapide de la fréquence accompagnée d'une augmentation rapide de la dissipation correspondant à la fixation des alcanethiols sur la surface. Le signal de fréquence décroît lentement pendant plusieurs heures puis tend à se stabiliser. Cette dérive est interprétée comme le réarrangement

des chaînes alcanes pour former une monocouche organisée¹²² ainsi qu'à la densification de cette couche par comblement des défauts. Après rinçage à l'éthanol au bout de quinze heures environ (2^{nde} flèche) un signal stable est obtenu. Cette expérience démontre l'importance du temps de contact entre la surface d'or et la solution de thiol pour obtenir une monocouche complète. Dans le protocole que nous avons utilisé pour l'ensemble des expériences, un temps de contact au minimum de douze heures a systématiquement été utilisé. La variation de dissipation d'énergie largement inférieure à 1.10^{-6} après le rinçage indique la formation d'une couche mince et rigide permettant ainsi d'appliquer l'équation de Sauerbrey pour déterminer la masse de la monocouche de thiols adsorbée sur la surface. Le même profil d'adsorption et de réorganisation de la couche est observé pour le PEG-biotine. Les résultats sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Quantités de thiol PEG-OH et de thiol PEG-biotine adsorbées sur un cristal de quartz, mesurées par QCM-D.

	$\Delta F_3/3$ (Hz)	$\Delta F_5/5$ (Hz)	$\Delta F_7/7$ (Hz)	Masse surfacique moyenne (ng/cm ²)
PEG-OH	14,36	14,42	14,33	254,4 ± 0,8
PEG-biotine	18,84	18,57	18,40	329,3 ± 3,8

Le Tableau 1 donne les variations de fréquence obtenues pour chacune des trois harmoniques enregistrées et la masse surfacique moyenne calculée avec la relation de Sauerbrey. On remarque en effet que la variation de fréquence due à l'adsorption du thiol ne dépend quasiment pas de l'ordre de l'harmonique confirmant ainsi l'obtention d'une couche rigide. A partir de ces valeurs, on peut faire une estimation de l'épaisseur des couches en utilisant la densité de l'éthanol (0,789 g/cm³) comme densité de la couche de thiol imprégnée d'éthanol.

$$e_{PEG-OH} = \frac{\Gamma}{\rho} = 3,3nm \quad \text{et} \quad e_{PEG-biotine} = \frac{\Gamma}{\rho} = 4,2nm$$

Avec : e_{PEG-OH} = épaisseur de la SAM de PEG-OH et $e_{PEG-biotine}$ = épaisseur de la SAM de PEG-biotine ; Γ = masse surfacique déterminée par QCM-D ; ρ = densité de l'éthanol.

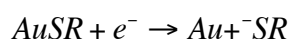
¹²² Love, J.C. ; Estroff, L.A. ; Kriebel, J.K. ; Nuzzo, R.G. ; Whitesides, G.M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.

On a expliqué dans le premier chapitre de ce manuscrit que les mesures effectuées en QCM-D étaient sensibles à la masse de matière organique adsorbée mais également à la quantité de solvant couplé à la couche. Il s'avère par conséquent nécessaire de caractériser les SAMs par d'autres techniques afin de vérifier si les masses acoustiques ne nous conduisent pas à surestimer la masse des thiolates effectivement adsorbés sur la surface d'or.

ii. Caractérisation des SAMs par électrochimie

• Désorption réductive

La désorption électrochimique des SAMs des surfaces d'or a été décrite et largement étudié par M. Porter.^{123,124} Le processus de désorption réductive implique la coupure de la liaison Au-S et la formation du thiolate correspondant selon la réaction suivante :



La quantité de courant mis en jeu lors de cette réduction permet de déterminer la quantité de molécules adsorbées sur la surface.

La Figure 30 montre les voltamogrammes obtenus pour PEG-OH et pour PEG-biotine adsorbés sur la surface d'or des quartzs de QCM. Pour chaque expérience, on observe un pic fin (A) proche de -1 V (Tableau 2), qui correspond à la réduction de la liaison Au-SR, suivi d'une petite vague (B) à un potentiel plus négatif (centrée sur -1,2 V). De tels pics supplémentaires ont déjà été observés préalablement et peuvent s'expliquer par le caractère polycristallin donc non homogène de la surface d'or ou par des zones de thiols adsorbés de façon très compacte sur la surface et donc plus difficile à réduire.^{121,125} Le pic A correspond à la désorption du thiol dont l'aire est proportionnelle à la concentration surfacique via la loi de Faraday.

$$\text{Loi de Faraday : } n_{AuSR} = \frac{Q}{F} \quad \Gamma_{AuSR} = \frac{n_{AuSR}}{A}$$

Avec n = nombre de mol ; Q = charge (Coulomb) ; F = Constante de Faraday, 96500 C/mol ; Γ_{AuSR} = concentration surfacique de thiol à la surface ; A = aire de la surface = 0,99 cm².

¹²³ Walczak, M.M. ; Popenoe, D.D. ; Deinhammer, R.S. ; Lamp, B.D. ; Chung, C. ; Porter, M.D. *Langmuir* **1991**, 7, 2687-2693.

¹²⁴ Widrig, C.A. ; Chung, C. ; Porter, M.D. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 310, 335-359.

¹²⁵ Kawaguchi, T. ; Yasuda, H. ; Shimazu, K. ; Porter, M.D. *Langmuir* **2000**, 16, 9830-9840.

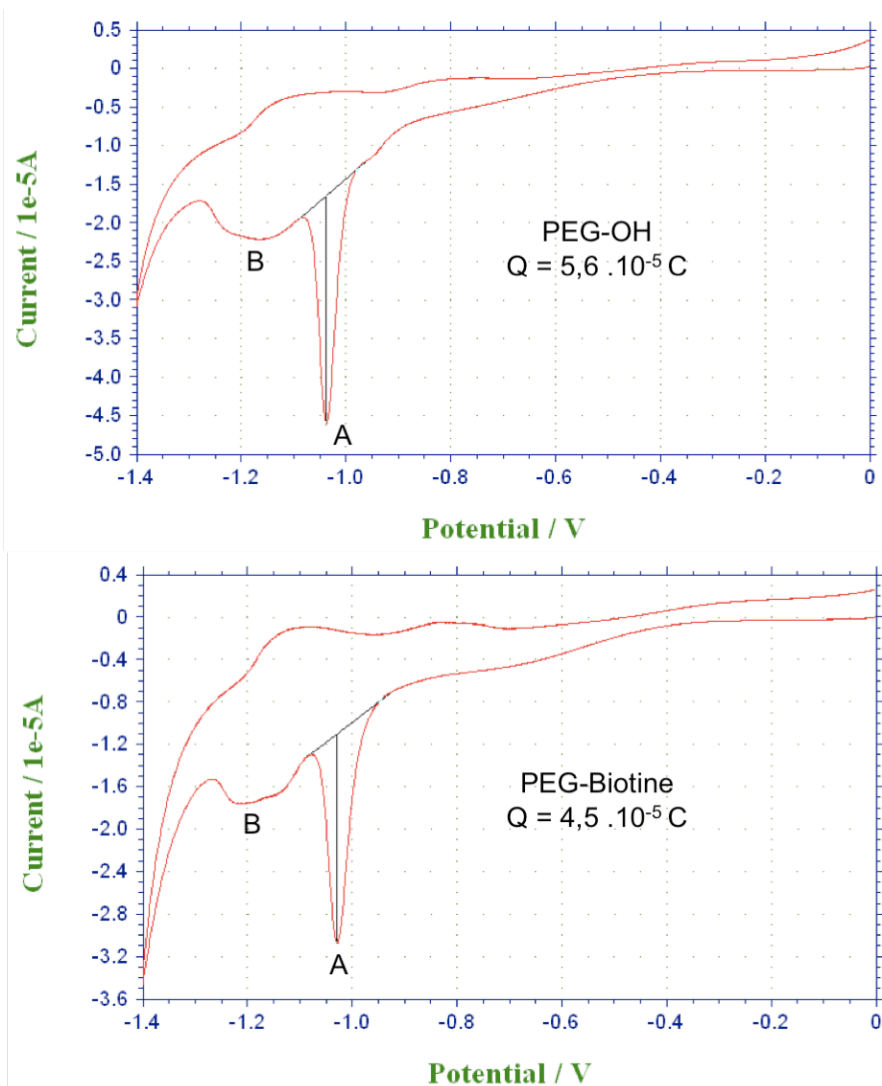


Figure 30 : Courbes de désorption réductive dans NaOH 0,5 M en voltamétrie cyclique ($v = 20 \text{ mV/s}$) pour une surface d'or greffée par PEG-OH (en haut) ou par PEG-biotine (en bas).

Il existe une incertitude sur les valeurs de concentration surfacique qui n'a pas été évalué ici et qui provient de deux facteurs :

- Les calculs ont été effectués en considérant la surface géométrique de la surface et non la surface réelle.
- Les calculs ne tiennent pas compte de l'augmentation du courant capacitif au cours de la réduction des thiolates (Cf paragraphe suivant sur les mesures de capacité de double couche p. 92)

Le Tableau 2 permet de comparer les différents paramètres obtenus au cours des expériences de désorption réductive d'une couche de PEG-OH, d'une couche mixte à 10% de PEG-biotine et d'une couche de PEG-biotine.

Tableau 2 : Résultats obtenus lors de la désorption réductrice des SAMs dans NaOH 0,5 M en voltamétrie cyclique.

	PEG-OH	10% PEG-biotine	PEG-biotine
Potentiel de pic (mV)	-1,05 (\pm 0,02)	-1,05 (\pm 0,03)	-1,04 (\pm 0,03)
Largeur de pic à mi-hauteur (mV)	37 (\pm 4)	38 (\pm 3)	41 (\pm 2)
Charge (μ C/cm ²) du pic de réduction	66,4 (\pm 6)	61,8 (\pm 3)	50,2 (\pm 8)
Γ_{AuSR} (mol/cm ²)	6,9 (\pm 0,7) .10 ⁻¹⁰	6,4 (\pm 0,3) .10 ⁻¹⁰	5,2 (\pm 0,8) .10 ⁻¹⁰
Surface occupée par une molécule (Å ²)	24,1		31,8
Masse molaire (g/mol)	380,58		694,00
Masse surfacique (ng/cm ²)	262 \pm 27		361 \pm 55

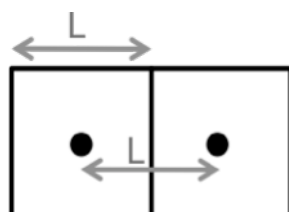
On voit sur le Tableau 2 que les potentiels de pic, généralement dépendant de la longueur de la chaîne alcane¹²⁶, sont ici sensiblement les mêmes pour les SAMs de différentes compositions. Les valeurs de la largeur du pic à mi-hauteur sont relativement faibles ce qui indique une homogénéité de la désorption, résultat des interactions de Van-der-Waals entre les molécules.¹²² La largeur de pic pour la couche de PEG-biotine est légèrement plus large que pour la couche de PEG-OH. Ceci pourrait être expliqué par le plus fort encombrement des groupes biotine par rapport aux fonctions hydroxyle qui conduit donc à une structure de la couche légèrement moins compacte. La charge obtenue permet de déduire une concentration surfacique et de calculer la surface occupée par une molécule de PEG-OH ou de PEG-biotine,

¹²⁶ Finklea, H. O. *Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances*; Bard, A.J. and Rubinstein, I., Eds.; Marcel Dekker: New York, **1996**, *19*, 109-335.

24,1 Å² et 31,8 Å² respectivement. Ces valeurs sont comparables à celle calculée par S. Jiang de 27,4 Å² pour une SAM de PEG-OH.¹²⁷ A partir des valeurs de concentration surfacique (Γ_{AuSR}) et de la masse molaire des molécules de thiol, on en déduit la masse surfacique pour les SAM de PEG-OH et de PEG-biotine. Les masses surfaciques ainsi obtenues par électrochimie sont comparables à celles mesurées par QCM-D.

Nous avons ainsi déterminé que la concentration surfacique en PEG-biotine est inférieure à celle en PEG-OH. Ceci pourrait être expliqué par la présence des groupements biotine plus encombrants que les simples terminaisons hydroxyles impliquant ainsi un nombre moins élevé de molécules sur la surface. P. Stayton⁵⁶ a utilisé la même molécule de PEG-OH pour former des SAMs et a déterminé une concentration surfacique de $4,5 \cdot 10^{-10}$ mol/cm² par XPS (spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X). Mais inversement, il a obtenu une monocouche de thiol biotinylé (dont la structure est présentée dans le Schéma 30) plus dense que la couche de PEG-OH. Il détermine des valeurs de 42 Å² par molécule de PEG-biotine et de 24 Å² par molécule de thiol biotinylé. Il est à noter que l'alcanethiol biotinylé utilisé dans leurs travaux possède deux groupes amide de part et d'autre des motifs éthylène glycol. Ceci pourrait favoriser la formation de liaisons hydrogène et permettrait donc d'obtenir une couche plus compacte. Les auteurs montrent par NEXAFS (Near-Edge X-ray Adsorption Fine Structure) que la SAM formée avec les PEG-OH est désordonnée alors que la monocouche d'alcanethiols biotinylés est plus organisée. Les résultats publiés par P. Stayton et son équipe sont différents de ceux que nous avons obtenus par électrochimie et par QCM-D. Afin de confirmer la plus forte compacité de la SAM de PEG-OH, nous avons approfondi l'étude électrochimique.

A partir de la surface occupée par une molécule d'alcanethiol, on peut en déduire la distance entre deux molécules. Si on considère qu'une molécule est au centre d'un carré de côté L, on a :



$L = (\sigma/R)^{1/2}$ Avec L = côté du carré ; σ = surface occupée par une molécule ; R = rapport de concentration entre les deux espèces.

¹²⁷ Zheng, J. ; Li, L. ; Chen, S. ; Jiang, S. *Langmuir*, **2004**, 20, 8931-8938.

En moyenne, une molécule de PEG-biotine dans la SAM est entouré par $1/R$ molécule de PEG-OH qui occupent une surface $A = \sigma/R$ soit un carré de côté L . Les deux molécules utilisées ici n'occupent pas la même surface, il n'est donc possible de calculer que les valeurs extrêmes possibles entre deux molécules de PEG-biotine.

Exemple pour $R = 10\%$ soit $R = 0,1$

$$\text{Si } \sigma_1 = 24,1 \text{ \AA}^2 = 0,241 \text{ nm}^2 = 0,241 \cdot 10^{-18} \text{ m}^2$$

$$\text{Alors } L_1 = (0,241 \cdot 10^{-18} / 0,1)^{1/2} = 1,55 \cdot 10^{-9} \text{ m} = \underline{1,55 \text{ nm}}$$

$$\text{Si } \sigma_2 = 31,8 \text{ \AA}^2 = 0,318 \text{ nm}^2 = 0,318 \cdot 10^{-18} \text{ m}^2$$

$$\text{Alors } L_2 = (0,318 \cdot 10^{-18} / 0,1)^{1/2} = 1,78 \cdot 10^{-9} \text{ m} = \underline{1,78 \text{ nm}}$$

On peut donc penser qu'à 10% de PEG biotine dans la SAM, deux molécules de PEG-biotine sont espacées d'environ 1,66 nm (moyenne de L_1 et L_2) en considérant une distribution homogène des groupes biotine sur la surface.

• **Mesure de la capacité de double couche**

La mesure de la capacité de double couche (C_{dl}) permet de déduire des informations sur la compacité de la couche. L'interface surface/électrolyte peut être assimilée aux deux plaques d'un condensateur (Schéma 31).

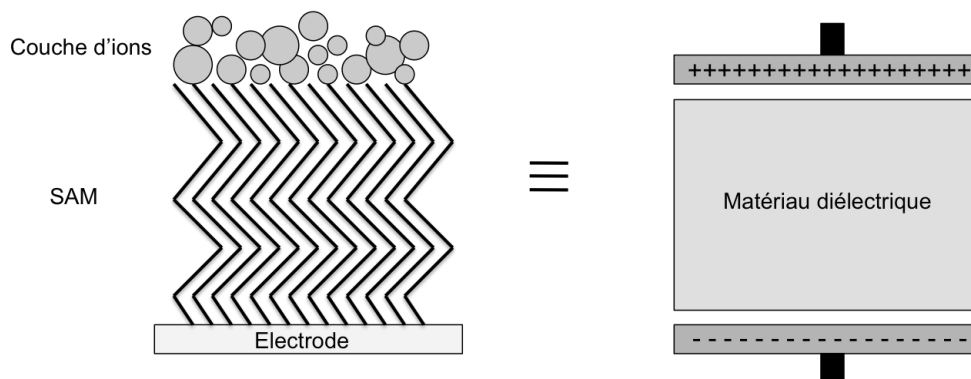


Schéma 31 : Modélisation d'une électrode modifiée par une SAM par un condensateur de plaques parallèles avec un matériau diélectrique.

La capacité de double couche est un paramètre caractéristique de cette interface. Si la surface de l'électrode est masquée (par une couche d'alkanethiols par exemple) la capacité de double couche diminue comme si les deux plaques étaient plus éloignées. La capacité de double couche est déterminée ici par voltamétrie cyclique, en mesurant le courant résiduel, qui est appelé courant capacitif i_{capa} dans un domaine où il est indépendant du potentiel appliqué (flèche sur la Figure 31a).

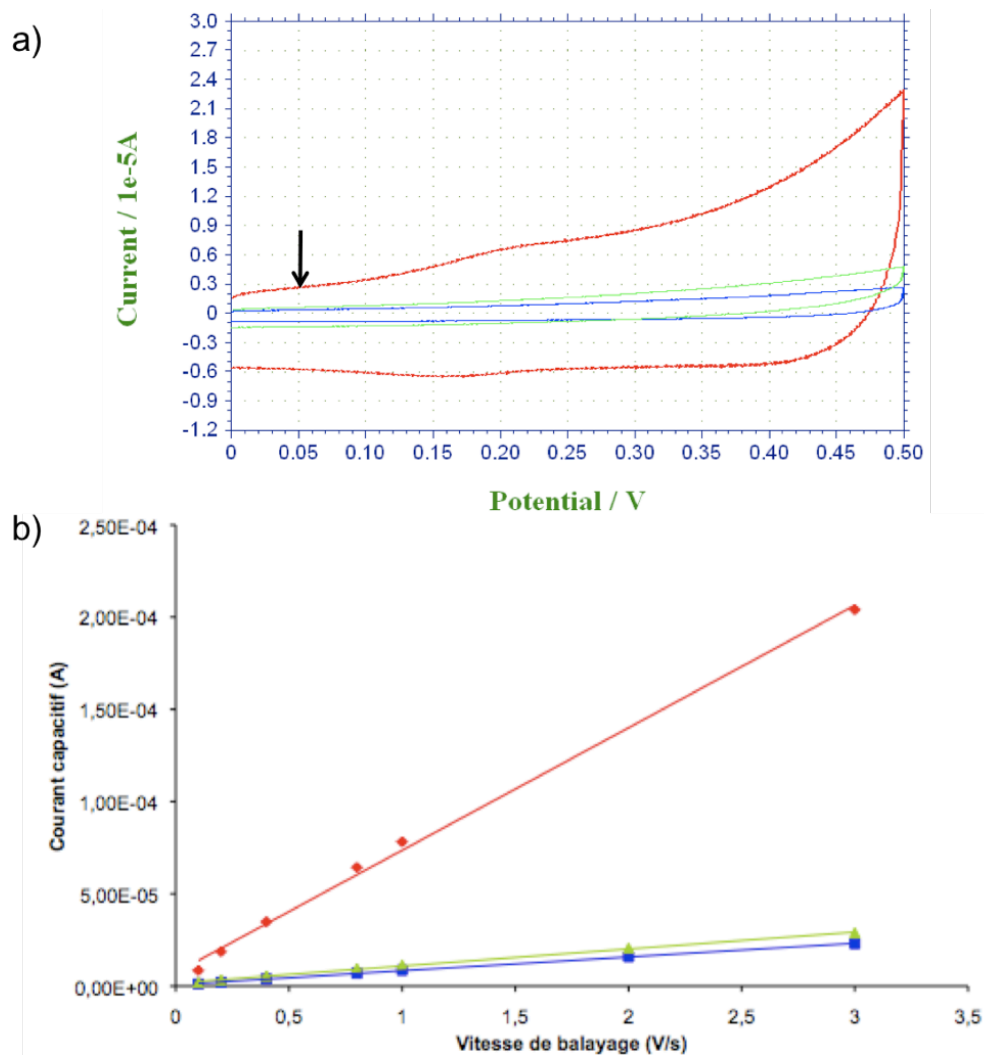


Figure 31 : a) Voltamogrammes cycliques enregistrés à 0,1 V/s dans Na₂SO₄. b) Tracés de l'intensité du courant capacitif (mesuré à 0,05 V) en fonction de la vitesse de balayage. En rouge, or nu ; en bleu, PEG-OH ; en vert, PEG-biotine.

La Figure 31a montre qu'après la fonctionnalisation du quartz (courbe bleue pour PEG-OH et courbe verte pour PEG-biotine), le courant capacitif a fortement diminué par rapport à l'électrode nue (courbe rouge). Ceci est dû à la fonctionnalisation de la surface par la SAM qui passive la surface.

Des balayages successifs à des vitesses de 0,1 à 3 V/s dans une solution aqueuse de Na₂SO₄ à 0,1 M permettent de déterminer les courants capacitifs. Ces courants (i_{capa}) sont proportionnels aux vitesses (v) de balayage de potentiel (Figure 31b).

$$I_{\text{capa}} = C.v$$

Les pentes des droites obtenues représentent donc la capacité (C) en μF . Pour normaliser les valeurs obtenues par rapport à la surface réelle, nous avons utilisé la relation suivante qui permet de calculer la grandeur C_{dl} en $\mu\text{F}/\text{cm}^2$:

$$C_{\text{dl}} = \frac{i_{\text{capa}}}{2vA}$$

Avec $i_{\text{capa}} = |i_{\text{a}}| + |i_{\text{c}}|$ en Ampère, mesuré ici à 0,05 V ; v = vitesse de balayage en V/s ; A = aire de la surface = $0,95 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ mesuré par comparaison du signal électrochimique obtenu sur une surface d'aire connue.

Les valeurs de C_{dl} obtenues à partir des pentes des droites $i_{\text{capa}} = f(v)$ pour PEG-OH et PEG-biotine sont comprises entre 3,5 et 4,5 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ce qui est bien inférieure à la valeur déterminée pour l'or nu de 30,9 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Ces valeurs sont conformes à celles mesurées pour la plupart des SAMs d'alcanethiols contenant plus de 10 atomes de carbones (les capacités de double couches sont en général comprises entre 1 et 5 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$).¹²⁶ La forte diminution de la capacité de double couche indique que la SAM agit en tant qu'espaceur en augmentant la distance entre l'électrode et la couche d'ions. Les valeurs très différentes obtenues entre l'or nu et les SAMs démontrent ainsi un recouvrement homogène de la surface.

• Etude de la compacité de la couche

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la compacité des SAMs, nous avons également étudié, en voltamétrie cyclique, le comportement d'une sonde redox diffusant à l'électrode. Le ferrocène-méthanol (FcMeOH) est une molécule monoélectronique, neutre et plutôt hydrophobe dont le processus d'oxydo-réduction est réversible. L'oxydation du FcMeOH en radical cation Fc^+MeOH sera ralentie si la monocouche est suffisamment compacte pour limiter la diffusion du FcMeOH à travers les défauts de la SAM.

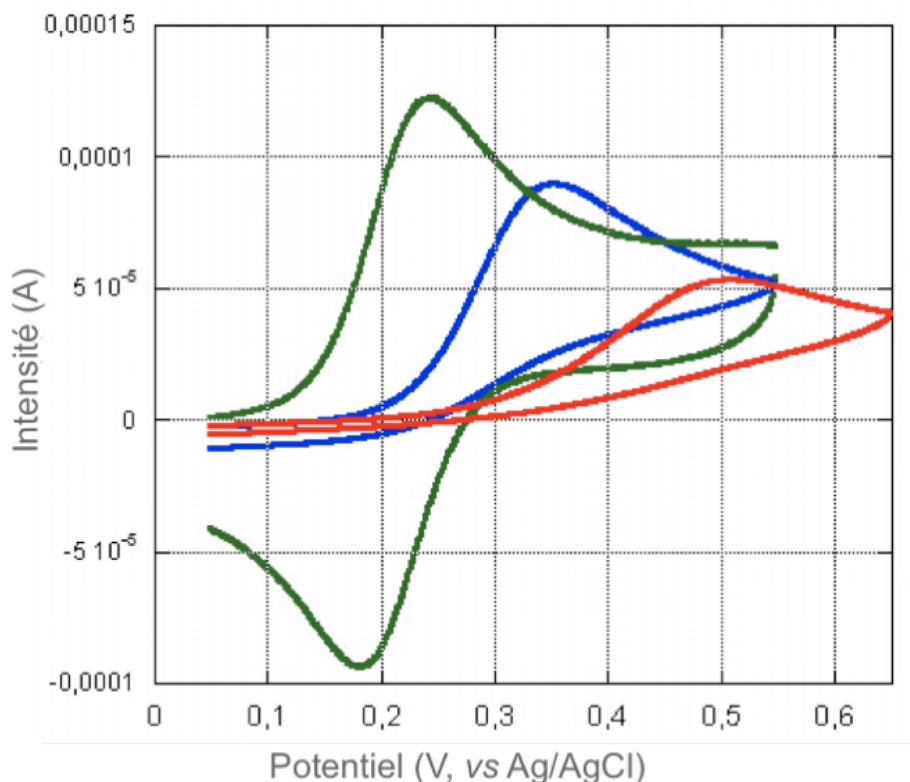


Figure 32 : Voltamogrammes cycliques de l'oxydo-réduction du FcMeOH à 5.10^{-4} M ($v = 100$ mV/s) sur or nu dans Na_2SO_4 (courbe verte), sur PEG-OH dans Na_2SO_4 0,1 M (courbe rouge) ou dans KPF_6 0,1 M (courbe bleue).

Les voltamogrammes de la Figure 32 comparent les réponses électrochimiques obtenues pour une surface d'or nu (dans Na_2SO_4 0,1 M, en vert) et pour une surface de PEG-OH sur l'or (dans KPF_6 0,1 M, en bleu, et dans Na_2SO_4 0,1 M, en rouge). La forme de la courbe rouge est caractéristique de la sonde FcMeOH sur électrode d'or. Sur or nu, le potentiel du pic d'oxydation est de 0,238 V (Valeur théorique $E^\circ = 1/2 (E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}}) = 0,212$ V vs. Ag/AgCl dans Na_2SO_4 et 0,208 V dans KPF_6). On observe ainsi un décalage de potentiel de 260 mV pour l'oxydation dans Na_2SO_4 sur la monocouche de PEG-OH par rapport à l'or nu. Le balayage retour ne montre pas distinctement de vague de réduction de l'ion ferrocenium dans l'intervalle de potentiel étudié. Le décalage observé entre la courbe bleue et la courbe rouge de la Figure 32, qui correspondent à l'oxydation du FcMeOH en présence de PF_6^- et de SO_4^{2-} , peut être expliqué par la différence d'hydrophobicité de ces deux contre-ions. En effet, l'ion PF_6^- hydrophobe, forme une paire d'ions plus forte avec l'espèce Fc^+ ce qui favorise cinétiquement la formation de cette espèce.¹²⁸ De tels résultats de limitation des réactions faradiques à travers une SAM ont déjà été observés sur une électrode modifiée par un

¹²⁸ Rowe, G.K. ; Creager, S.E. *Langmuir*, **1991**, 7, 2307-2312.

dodécane-thiol en présence de ferrocène-méthanol¹²⁹ ou par un alcanethiol C₁₆EG₆C₁₆ en présence de Fe(CN)₆³⁻¹³⁰. Les différences observées entre l'or nu et la SAM formée de PEG-OH montrent que la monocouche limite la diffusion des sondes redox permettant ainsi de confirmer que la SAM est compacte et organisée.

La Figure 33 présente les réponses électrochimiques du FcMeOH dans Na₂SO₄ obtenues pour une surface d'or nu (en vert) et pour une surface de PEG-biotine sur l'or (en bleue) superposée avec celle obtenue pour une surface de PEG-OH (en rouge).

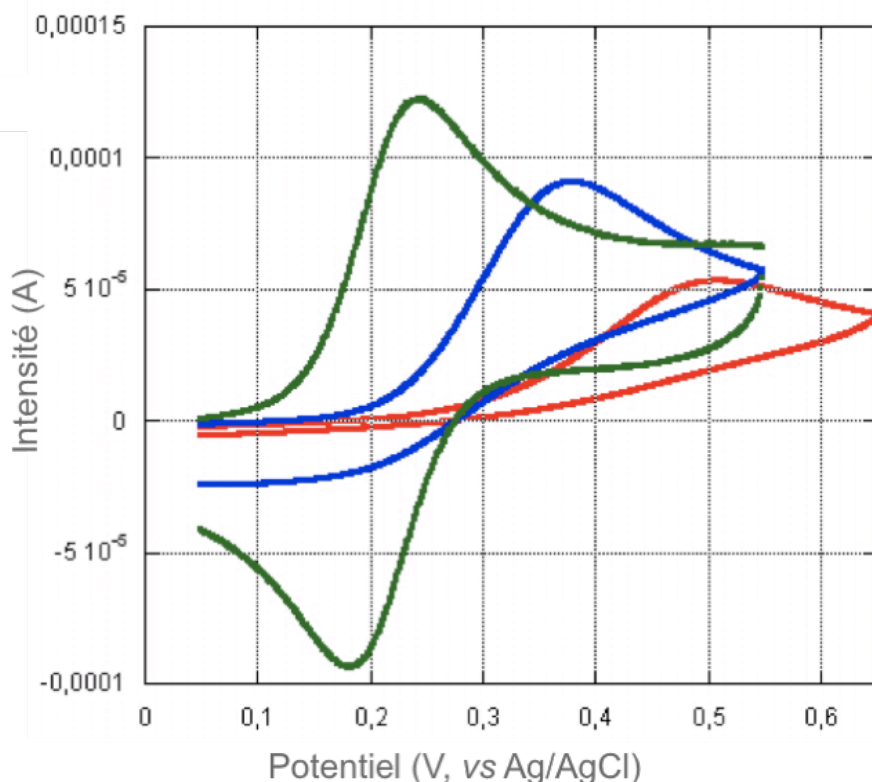


Figure 33 : Voltammogrammes cycliques de l'oxydo-réduction du FcMeOH à 5.10⁻⁴ M dans Na₂SO₄ 0,1 M (v = 100 mV/s) sur or nu (courbe verte), sur PEG-OH (courbe rouge) et sur PEG-biotine (courbe bleue).

La Figure 33 permet d'observer pour la monocouche de PEG-biotine un décalage positif d'environ 140 mV du pic d'oxydation du FcMeOH par rapport à l'or nu. De plus, comme dans le cas de la monocouche de PEG-OH, aucune vague retour n'apparaît dans la zone de potentiel étudié. La couche de PEG-biotine ralentit ainsi le processus d'oxydo-réduction du ferrocène. Malgré la présence des groupements biotine plus encombrants qui pourraient donc désorganiser la couche, on ne constate pas de défaut qui laisserait diffuser la sonde redox.

¹²⁹ Creager, S.E. ; Hockett, L.A. ; Rowe, G.K. *Langmuir*, **1992**, 8, 854-861.

¹³⁰ Valiokas, R. ; Östblom, M. ; Björefors, F ; Liedberg, B. ; Shi, J. ; Konradsson, P. *Biointerphases*, **2006**, 1, 22-34.

Afin de quantifier le processus d'oxydation de la sonde rédox, nous avons exécuté une analyse cinétique du comportement électrochimique du FcMeOH à l'interface or/SAMs PEG-OH et PEG-biotine. Pour ce faire, des voltamogrammes cycliques ont été enregistrés à des vitesses de balayage de potentiels s'étendant de 0.1 à 3 V/s. A partir de ces courbes, nous avons calculé la constante apparente de transfert d'électrons k^0 lors de l'oxydation du FcMeOH à l'interface Au/SAM en considérant que l'oxydation se produit dans les défauts de la monocouche sur la surface non recouverte par les alcanethiols. On utilise ici le modèle des « pinholes »¹³¹ pour lequel le comportement électrochimique de la sonde redox dépend fortement de la fraction de surface recouverte θ aussi bien que du désordre structural de la monocouche (Schéma 32).

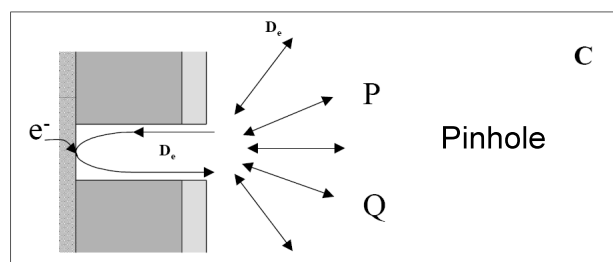


Schéma 32 : Représentation schématique du modèle des « pinholes » où la sonde redox diffuse de la solution à la surface d'or via des défauts dans SAM. P/Q est un système redox soluble et D_e représente le coefficient de diffusion de la sonde redox au sein de la solution.

Le calcul de la constante apparente de transfert de charge k^0 a été exécuté de deux manières différentes. La première méthode considère le cas d'un système redox totalement irréversible. L'expression du courant faradique de pic I_p est alors donné par l'équation suivante¹³² :

¹³¹ Amatore, C.; Savéant, J. M.; Tessier, D. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, 147, 39-51.

¹³² Bard, A.J. et Faulkner, L.R. "Electrochimie. Principes, méthodes et applications", Masson, Paris, 1983.

$$I_p = 0,227nFACk^{\circ} \exp\left[\alpha_{app}n \frac{F}{RT} (E_p - E^{\circ})\right]$$

$$\text{D'où on obtient : } \ln\left(\frac{I_p}{0,227nFAC}\right) = \ln(k^{\circ}) + \left[\alpha_{app}n \frac{F}{RT} (E_p - E^{\circ})\right]$$

Avec I_p = Intensité du courant de pic ; n = Nombre d'électron échangé ; F = Constante de Faraday, 96485 C/mol ; A = Aire de l'électrode ; C = Concentration de l'espèce en solution ; α_{app} = Coefficient apparent de symétrie pour l'oxydation du FcMeOH; R = Constante des gaz parfaits ; T = Température en degré Kelvin ; E_p = Potentiel de pic ; E° = Potentiel standard apparent = 0,212 V vs Ag/AgCl pour Fc⁺/Fc en milieu Na₂SO₄ et 0,208 V vs Ag/AgCl en milieu KPF₆.

En traçant le graphe de $\ln\left(\frac{I_p}{0,227nFAC}\right)$ en fonction de $(E_p - E^{\circ})$ pour différentes vitesses de balayage, on obtient une droite dont l'ordonnée à l'origine est $\ln(k^{\circ})$. Ces calculs ont été appliqués à l'oxydation du FcMeOH à la concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ sur une surface Au/PEG-OH dans un électrolyte aqueux à 0,1 M en Na₂SO₄ d'une part ou 0,1 M en KPF₆ d'autre part et également sur une surface Au/PEG-biotine dans un électrolyte 0,1 M en Na₂SO₄. Pour chacune des trois études, nous avons préalablement vérifié la proportionnalité des courants de pic avec la racine carrée de la vitesse de balayage et confirmé que le transport de cette espèce redox est sous contrôle diffusionnel (Figure 34). La Figure 35 présente les graphes $\ln k = f(E_p - E^{\circ})$. Les valeurs des courants faradiques sont obtenues par soustraction du courant capacitif au courant total.

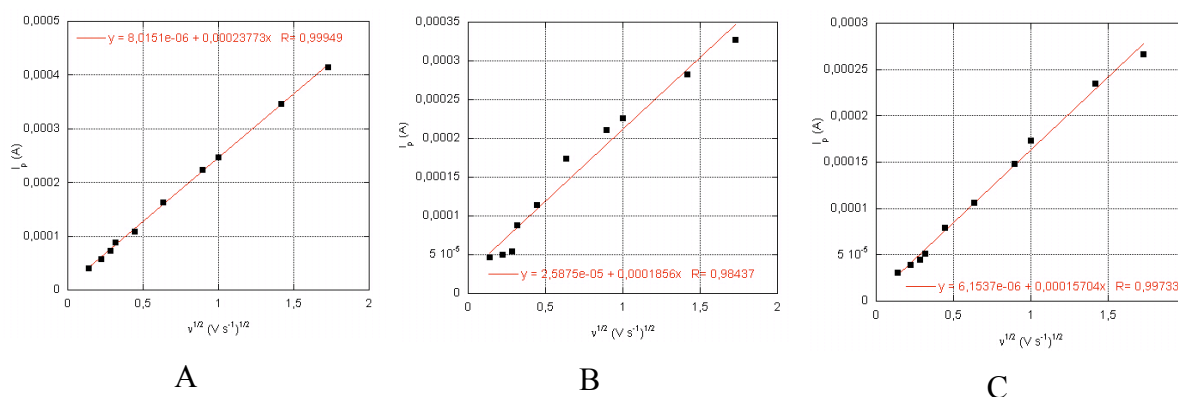


Figure 34 : Evolution des courants de pic relatifs à l'oxydation du FcMeOH $5 \cdot 10^{-4}$ M sur A) PEG-OH dans 0,1 M Na₂SO₄, B) PEG-OH dans 0,1 M KPF₆ et C) PEG-biotine 0,1 M Na₂SO₄. (Les SAMs sont adsorbées sur les surfaces d'or des quartz de QCM, Φ 1,1 cm)

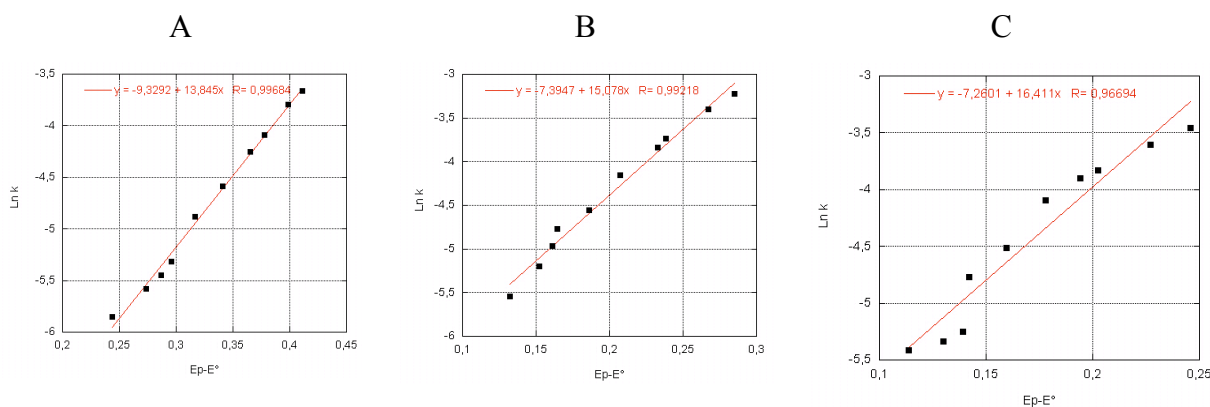


Figure 35 : Courbes représentant l'évolution de $\text{Ln } k$ en fonction de $E_p - E^\circ$ où $k = \left(\frac{I_p}{0,227FAC} \right)$ pour (A) l'oxydation de FcMeOH sur Au/PEG-OH dans 0,1 M Na_2SO_4 ; (B) l'oxydation de FcMeOH sur Au/PEG-OH dans 0,1 M KPF_6 et (C) l'oxydation de FcMeOH sur Au/PEG-biotine dans 0,1 M Na_2SO_4 pour différentes vitesses de balayages de 0,02 V/s à 3 V/s.

La deuxième méthode consiste à exploiter les courbes de voltamétrie cyclique dans le domaine de potentiel correspondant au pied du pic d'oxydation du FcMeOH. On peut alors considérer pour les faibles surtensions que la réponse faradique de l'électrode est gouvernée par la cinétique de transfert de charge. Nous avons alors déterminé la constante apparente de transfert de charge en utilisant le modèle de Tafel. L'expression du courant faradique de transfert de charge correspondant au modèle de Tafel s'exprime par les équations suivantes :

$$I = nFACk^\circ \exp\left[\alpha_o \frac{nF}{RT} (E - E^\circ)\right] \quad \text{et} \quad k = \frac{I}{nFAC}$$

$$\text{On a donc} \quad k = k^0 \exp\left[\alpha_o \frac{nF}{RT} (E - E^0)\right] \quad \text{et} \quad \ln k = \ln k^0 + \alpha_o \frac{nF}{RT} (E - E^\circ)$$

La Figure 36 (A, C, E) présente les branches anodiques d'oxydation du ferrocène méthanol sur les surfaces Au/PEG-OH et Au/PEG-biotine pour différentes vitesses de balayage. Les courants faradiques apparaissent indépendants de la vitesse de balayage de potentiel. Ce résultat démontre que dans le domaine de potentiel exploré, la réponse de l'électrode est contrôlée par la cinétique de transfert d'électron sans aucune contribution de la diffusion de la sonde redox. La constante apparente de vitesse limite de transfert d'électron k^0 pour l'oxydation du FcMeOH peut alors être déterminée à partir des tracés de Tafel (Figure 36 B, D, F). Cette figure présente pour plusieurs vitesses de balayage de potentiel les courbes de $\text{Ln } (k)$ en fonction de $(E - E^\circ)$.

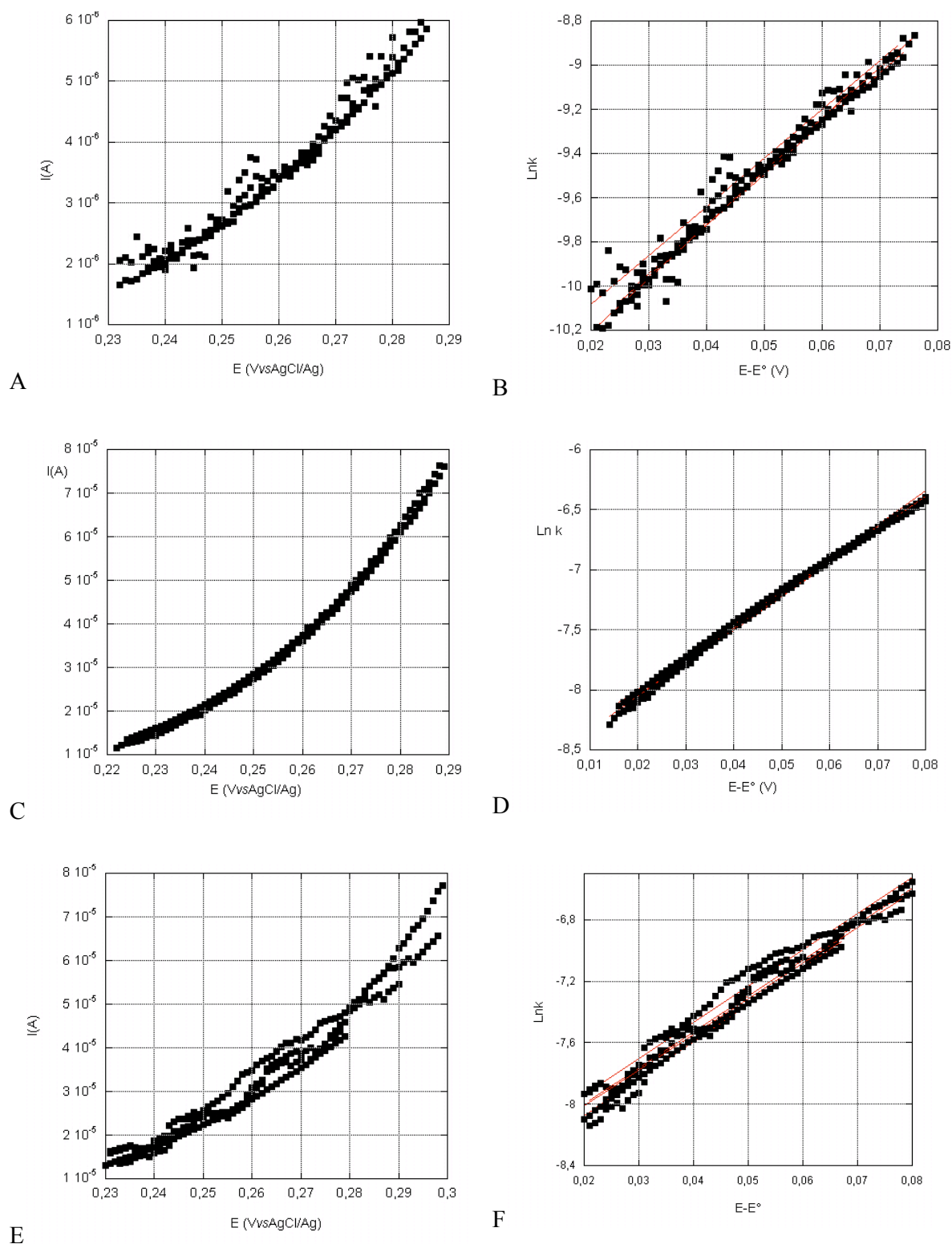


Figure 36 : Courbes représentant d'une part l'évolution du courant faradique d'oxydation du FcMeOH en fonction des potentiels appliqués (A (sur Au/PEG-OH en milieu Na_2SO_4), C (sur Au/PEG-OH en milieu KPF_6) et E (sur Au/PEG-biotine en milieu Na_2SO_4)) et pour différentes vitesses de balayage (0,2 V/s, 0,4 V/s, 0,8 V/s, 1 V/s et 2 V/s) et d'autre part les représentations de Tafel de ces intensités $\text{Ln } k = f(E - E^\circ)$ où $E^\circ = 0,212$ V en milieu Na_2SO_4 et 0,208 V en milieu KPF_6 (B (sur Au/PEG-OH en milieu Na_2SO_4), D (sur Au/PEG-OH en milieu KPF_6) et F (sur Au/PEG-biotine en milieu Na_2SO_4)).

A partir de la valeur moyenne de l'ordonnée à l'origine des droites des Figure 35 et Figure 36 (B, D, F), nous avons obtenu les valeurs moyennes des constantes de vitesse k^0 (Tableau 3) et à partir de leur pente les valeurs moyennes des coefficients de transfert de charge α_0 pour l'oxydation du FcMeOH. Le Tableau 3 montre que les valeurs de k^0 calculées par le modèle de Tafel sont plus faibles mais du même ordre de grandeur que celles calculées à partir des courants de pic. En outre, on observe la même évolution des k^0 en fonction du système étudié.

Tableau 3 : Récapitulatif des paramètres cinétiques mesurés sur Au/SAM pour l'oxydation de la sonde redox FcMeOH au moyen de l'analyse des intensités de courant de pic. Les résultats obtenus par l'analyse de Tafel sont donnés entre parenthèse.

Système étudié	k^0 (cm/s)	α_0	θ
FcMeOH sur Au/PEG-OH en milieu Na_2SO_4	$8,88 \cdot 10^{-5}$ ($2,43 \cdot 10^{-5}$ par Tafel)	0,35 (0,58)	0,99945 (0,99985)
FcMeOH sur Au/PEG-OH en milieu KPF_6	$7,03 \cdot 10^{-4}$ ($1,84 \cdot 10^{-4}$ par Tafel)	0,41 (0,71)	0,99560 (0,99885)
FcMeOH sur Au/PEG-biotine en milieu Na_2SO_4	$6,15 \cdot 10^{-4}$ ($2,08 \cdot 10^{-4}$ par Tafel)	0,38 (0,60)	0,99609 (0,9987)

Les valeurs de k^0 sont beaucoup plus faibles que celles mesurées sur or nu $k^0 = 0,16 \text{ cm/s}^{121}$, d'un facteur 1800 à l'interface Au/PEG-OH dans Na_2SO_4 et d'un facteur 250 pour les deux autres systèmes étudiés. La constante de vitesse de transfert est environ dix fois plus élevée dans le cas de PF_6^- que de SO_4^{2-} pour l'oxydation du FcMeOH sur Au/PEG-OH. Ce résultat est en accord avec le fait que l'oxydation du FcMeOH est facilitée en présence de PF_6^- qui forme des paires d'ions plus fortes que SO_4^{2-} avec les cations ferrocénium. En revanche on note que la valeur de k^0 est plus élevée sur Au/PEG-biotine que sur Au/PEG-OH ; ce résultat signifie que la SAM biotinylée présenterait un plus grand nombre de défauts.

Assumant que tout le courant passe via les zones nues sur l'électrode, il a été montré qu'à haut taux de recouvrement de la surface ($\theta \sim 1$), la constante apparente de transfert de charge hétérogène est reliée à θ et est donnée par l'expression suivante¹³¹ :

$$k_{\text{Au}/\text{SAM}}^0 = (1 - \theta)k_{\text{Au}}^0$$

où k_{Au}^0 et $k_{\text{Au}/\text{SAM}}^0$ sont les constantes de transfert de charge hétérogène mesurées respectivement sur les électrodes d'or nue et modifiée Au/SAM. Il en résulte que, par utilisation du modèle des « pinholes » et de cette équation, le taux de recouvrement de la surface peut être déduit des valeurs de k^0 obtenues par les deux méthodes. Le Tableau 3 montre que les valeurs de θ sont proches de 1, cette forte valeur du taux de recouvrement indique que, pour ce qui concerne l'électrochimie de FcMeOH, un recouvrement quasi-parfait de la surface d'or est accompli par les SAMs PEG-OH et PEG-biotine qui présentent très peu de défauts.

iii. Mesure de l'épaisseur de la SAM par ellipsométrie

Afin de déterminer l'épaisseur de la couche de SAM, des mesures par ellipsométrie ont été effectuées sur des films secs. Ces mesures ont nécessité, dans un premier temps, la caractérisation de la surface d'or nu. L'analyse des propriétés optiques de la surface d'or fonctionnalisées par la SAM a ensuite été effectuée.

Les angles ellipsométriques du substrat d'or nu (Ψ et Δ) sont analysés en utilisant un modèle à deux phases (substrat/air ambiant) qui permet d'obtenir les propriétés optiques de la couche d'or par l'intermédiaire de l'indice de réfraction n_s et du coefficient d'extinction molaire k_s de la surface (s). Ces deux valeurs sont spécifiques de la surface étudiée et varient d'une surface à l'autre. Ces valeurs sont ensuite utilisées pour analyser les données du substrat modifié par la SAM, sur la base d'un modèle dit à trois phases (substrat/SAM/air ambiant). En utilisant la valeur fixe de $n_{\text{SAM}} = 1,45$ correspondant à l'indice de réfraction d'une couche organique et $k_{\text{SAM}} = 0$ (la couche organique n'absorbe pas à la longueur d'onde de travail), on détermine l'épaisseur d_{SAM} de la monocouche (Tableau 4).

Tableau 4 : Valeurs moyennes d'épaisseur des SAM sur les quartz d'or, mesurées par ellipsométrie.

	PEG-OH	50% PEG-biotine	PEG-biotine
Epaisseur ellipsométrique d_{SAM}	2,23 nm \pm 0,42	2,55 nm \pm 0,42	2,18 nm \pm 0,67

A partir des valeurs moyennes données dans le Tableau 4, on ne voit pas d'évolution de l'épaisseur en fonction de la fraction molaire des deux thiols. On a également un problème de

reproductibilité des mesures. On peut simplement en conclure que l'épaisseur moyenne des SAM formées est comprise entre 2 et 2,5 nm. Ses valeurs peuvent être comparées à celle de la littérature. B. Liedberg détermine une épaisseur de 3,39 nm pour une surface de thiolate C₁₁-EG₄-OH¹³³ et de 3,89 nm¹³³ ou de 3,3 nm¹³⁴ pour une surface de thiolate C₁₁-EG₆-OH. Ces valeurs de la littérature sont relativement proches de celles préalablement trouvées par QCM-D. M. Grunze a réalisé une étude structurale de SAMs OEG sur or et a calculé l'épaisseur de la monocouche d'alcanethiol en considérant une inclinaison de 30° des chaînes par rapport à la normale de la surface.¹³⁵ En considérant ainsi un incrément de 1,1 Å par groupe méthylène et de 2,78 Å par groupe éthylène glycol, on obtient dans notre cas une longueur de 2,32 nm pour la molécule de PEG-OH. Cette valeur est comparable aux valeurs mesurées par ellipsométrie.

iv. Mesures de l'angle de contact

Afin de confirmer la distribution homogène des PEG-biotine sur la surface, nous avons réalisé des mesures d'angle de contact. Cette méthode permet de mesurer l'étalement d'une goutte d'eau sur une surface. Plus la surface est hydrophile, plus la goutte d'eau est étalée et est donc associée à une faible valeur d'angle de contact. On devrait ainsi pouvoir extraire le pourcentage de biotine dans la couche si les surfaces de PEG-OH et de PEG-biotine ne présentent pas la même hydrophilicité. En effet, la loi de Cassie établit une corrélation entre la mesure d'angle de contact d'un liquide déposé sur une surface composite et la composition de la surface sur laquelle est effectué le dépôt. S. Evans¹³⁶ a montré que cette relation était applicable à des SAMs mixtes de thiol-cholestérol et de mercaptoéthanol. Il montre que les mesures d'angle de contact permettent de déterminer la composition des monocouches mixtes, le cosinus de l'angle de contact étant proportionnel au pourcentage de thiol-cholestérol dans la SAM.

$$\text{Loi de Cassie} \quad \cos \theta = \chi_1 \cos \theta_1 + \chi_2 \cos \theta_2$$

Avec θ = Angle de contact sur la SAM mixte ; θ_1 et θ_2 = Angle de contact sur les SAM formées à partir des constituants purs 1 et 2 respectivement ; χ_1 et χ_2 = fractions molaires de chaque constituant dans la SAM mixte.

¹³³ Valiokas, R. ; Svedhem, S. ; Svensson, S.C.T. ; Liedberg, B. *Langmuir*, **1999**, *15*, 3390-3394.

¹³⁴ Valiokas, R. ; Svedhem, S. ; Östblom, M. ; Svensson, S.C.T. ; Liedberg, B. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5459-5469.

¹³⁵ Harder, P. ; Grunze, M. ; Whitesides, G.M. ; Laibnis, P.E. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426-436.

¹³⁶ Williams, L.M. ; Evans, S.D. ; Flynn, T.M. ; Marsh, A. ; Knowles, P.F. ; Bushby, R.J. ; Boden, N. *Langmuir*, **1997**, *13*, 751-757.

Le Tableau 5 présente les résultats des mesures effectuées sur différentes surfaces.

Tableau 5 : Valeurs d'angle de contact sur différentes surfaces. Chaque valeur correspond à la moyenne de trois mesures réalisées sur un quartz.

	Or nu	PEG-OH	PEG-biotine
Angle de contact	68,6°	32,7° ± 0,6°	31,6° ± 2,3°

Les valeurs d'angle de contact présentées dans le Tableau 5 correspondent aux deux compositions extrêmes de la SAM. Elles ne sont pas suffisamment différentes pour appliquer la loi de Cassie. Dans la littérature, on peut trouver un angle de 33° pour une SAM biotinylée avec seulement deux groupes éthylène glycol.⁵⁷ Cette valeur est comparable aux valeurs trouvées dans notre étude. On peut conclure que les molécules de PEG-OH et de PEG-biotine ont des propriétés hydrophiles comparables et il est impossible de déduire des mesures d'angle de contact la composition de la surface.

b. Immobilisation de la streptavidine et du ligand -RGD- sur les SAMs

Une fois la SAM biotinylée formée, l'immobilisation de la streptavidine et du cyclodécapeptide **12** biotinylé présentant quatre ligands -RGD- sont suivies par QCM-D. La Figure 37 montre les courbes expérimentales correspondant à l'adhésion des biomolécules sur une SAM à 10% de PEG-biotine.

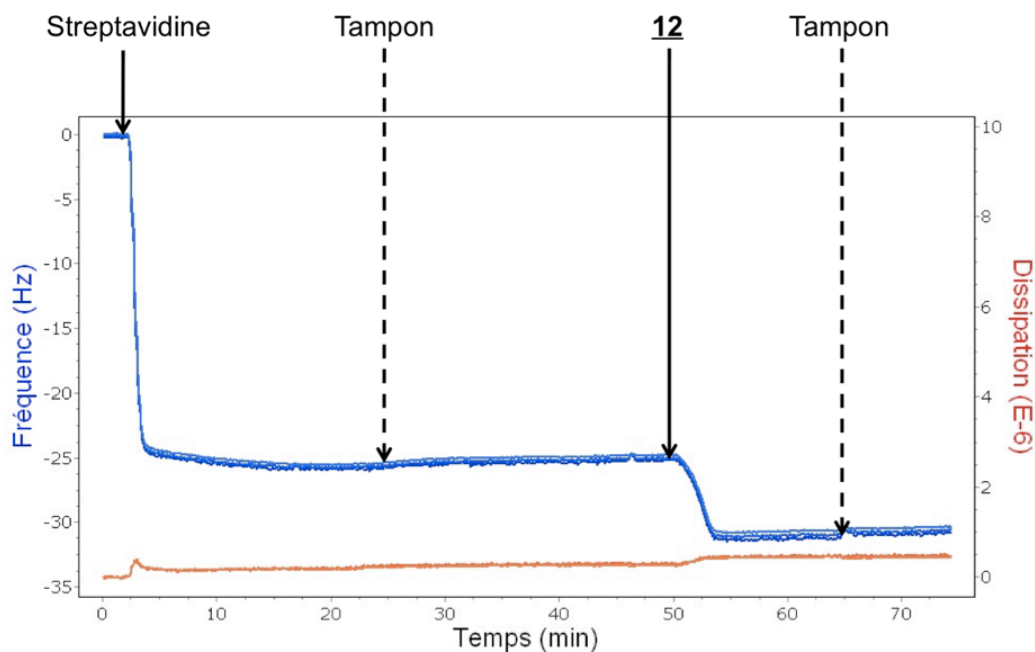


Figure 37 : Profils de QCM-D, correspondant aux 3^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} harmoniques, obtenus lors de la construction de la couche biomoléculaire de reconnaissance sur une SAM mixte préparée à partir de 10% de PEG-biotine.

On observe sur la Figure 37 que l'immobilisation de la streptavidine provoque une diminution de fréquence de $25,6 (\pm 2)$ Hz et une très faible augmentation de dissipation, inférieure à $0,5 \cdot 10^{-6}$. Ce profil a été obtenu un grand nombre de fois permettant de déterminer une incertitude faible de l'ordre de 2 Hz sur les variations de fréquence, la construction de l'assemblage est donc bien reproductible. Ces valeurs sont caractéristiques d'une couche rigide et bien ordonnée, solidaire des oscillations du cristal ce qui permet de calculer la masse de la couche de streptavidine immobilisée en utilisant l'équation de Sauerbrey. La valeur moyenne ainsi obtenue est de 453 ± 35 ng/cm². Cette valeur est comparable à celles rapportées dans la littérature. W. Knoll⁵⁹ a étudié l'adsorption de streptavidine sur une SAM-mixte à 10% de PEG-biotine par SPR et par QCM-D. Il compare les masses surfaciques obtenues par SPR à celles mesurées par QCM-D. Il détermine ainsi pour la couche de streptavidine des valeurs d'environ 380 ng/cm² en SPR et 455 ng/cm² en QCM-D montrant ainsi un rapport de 1,2 dans le calcul de la masse entre les deux techniques de mesure. Cette différence est expliquée par l'hydratation de la couche : la masse extraite des mesures réalisées par SPR correspond seulement à la matière organique tandis que la masse obtenue par QCM-D tient compte, en plus de la matière organique, de l'eau d'hydratation et des ions inclus dans la couche. En considérant le même taux d'hydratation de la couche et en appliquant ce rapport de 1,2 à la masse obtenue par QCM-D, nous en déduisons une densité

de surface de $3,79 \cdot 10^{12}$ molécules de streptavidine par cm^2 . Cette valeur peut être comparée au nombre de molécules de thiols biotinylés immobilisées sur la surface d'or. En considérant la valeur de densité en thiols adsorbés sur la surface obtenue en électrochimie pour 10% de PEG-biotine, on obtient $2,08 \cdot 10^{13}$ molécules de PEG-biotine par cm^2 . Ces valeurs correspondraient donc à 5,5 molécules de biotine pour une molécule de streptavidine au lieu des 2 attendues en moyenne. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'à des pourcentages inférieurs, la distance entre deux groupements biotine ne serait pas suffisante pour qu'ils puissent se lier à une même streptavidine. G. Lopez⁵⁷ a observé que la saturation en streptavidine d'une surface biotinylée était obtenue pour une fraction molaire en thiol biotinylé de 0,15 en utilisant les molécules suivantes :

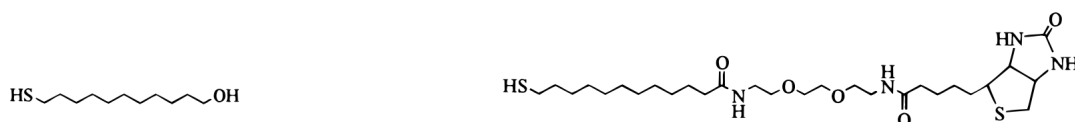


Schéma 33 : Molécules utilisées par G. Lopez pour former les SAMs mixtes biotinylées à différentes fractions molaires.⁵⁷

Dans ce cas, un calcul basé sur les aires occupées par les thiolates d'une part et la protéine d'autre part a montré qu'une fraction molaire de 0,15 en thiol biotinylé correspondait à 18 molécules de biotine pour une molécule de streptavidine.⁵⁷ Il a proposé plusieurs facteurs qui pourraient expliquer l'inaccessibilité de certains groupements :

- une ségrégation des thiols sur la surface qui impliquerait des « îlots » de PEG-biotine,
- une mauvaise orientation des fonctions biotine qui serait repliées dans la couche,
- une surface du substrat trop rugueuse qui impliquerait que des molécules de PEG-biotine immobilisées dans les « creux » soient enfouies dans la couche d'OEG.

Il est probable que ce soit une combinaison de toutes ces justifications qui reflète le mieux la réalité des phénomènes d'immobilisation.

Dans notre étude, l'immobilisation du ligand **12** sur cette couche de streptavidine à partir d'une solution à $1 \mu\text{M}$ provoque une diminution de fréquence de $5,8 (\pm 0,8)$ Hz et une augmentation de dissipation inférieure à $0,5 \cdot 10^{-6}$. La très faible variation de dissipation nous permet d'utiliser l'équation de Sauerbrey pour déterminer la concentration surfacique. On obtient ainsi une valeur de $103 (\pm 14)$ ng/cm^2 . En faisant l'hypothèse d'un taux d'hydratation équivalent à celui de la couche de streptavidine, on applique le facteur 1,2 déterminé par W. Knoll⁵⁹ et on en déduit une densité de surface de $1,26 \cdot 10^{13}$ molécules/ cm^2 . Cette valeur

correspond à 3,35 molécules de reconnaissance **12** par streptavidine ce qui est assez éloignée de la valeur moyenne de 2 molécules de biotine par streptavidine si l'on suppose que 2 des 4 sites actifs de la streptavidine sont impliqués dans des liaisons avec les biotines de la surface. L'hydratation de la couche serait donc plus élevée dans le cas des molécules cyclodécapeptidiques que dans le cas de la streptavidine. Néanmoins, on peut considérer que tous les sites de liaisons de la streptavidine sont saturés par la molécule de reconnaissance **12**. Il est intéressant de comparer la masse surfacique expérimentale obtenue pour l'immobilisation du ligand **12** sur la surface à une valeur calculée en considérant une monocouche dense de streptavidine. A partir de l'aire projetée⁵⁵ d'une molécule de streptavidine de 25 nm^2 , on peut déterminer une concentration surfacique en streptavidine de $40\,000 \text{ molécules}/\mu\text{m}^2$. En considérant que chaque molécule de streptavidine fixe deux ligands biotinylés, on obtient une masse surfacique de ligands de $54,5 \text{ ng}/\text{cm}^2$. L'écart à la valeur expérimentale ($103 \text{ ng}/\text{cm}^2$) peut être expliqué d'une part par l'eau d'hydratation que l'on détecte en QCM-D et d'autre part par le fait que la streptavidine ne s'adsorbe pas sur la SAM en formant une monocouche dense et régulière.

Nous avons évalué par QCM-D les propriétés anti-adhésives de la SAM de PEG-OH vis-à-vis de la streptavidine. La Figure 38 présente le profil de QCM-D lors de la mise en contact d'une couche de PEG-OH avec une solution de streptavidine.

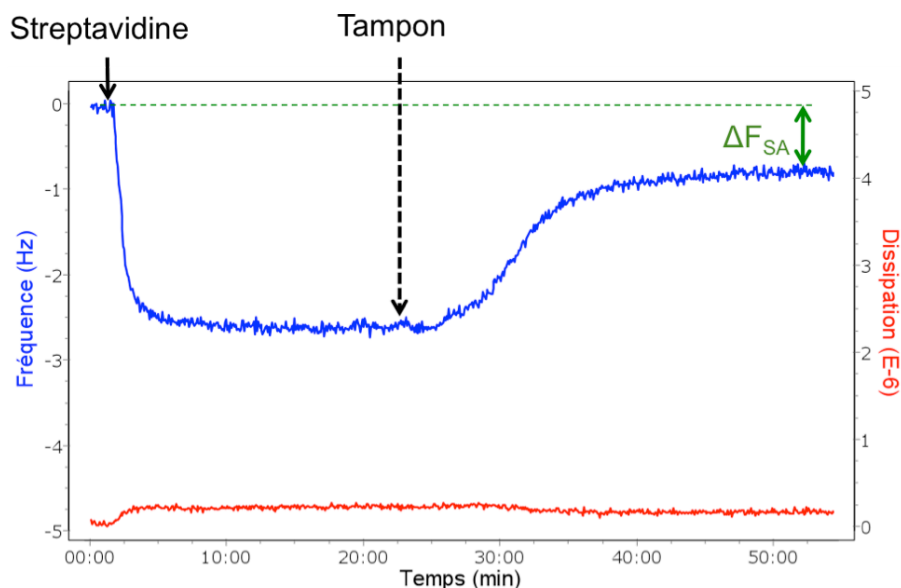


Figure 38 : Profil de QCM-D (fréquence en bleu et dissipation en rouge, 7^{ème} harmonique) pour l'adsorption non spécifique de la streptavidine sur une surface de PEG-OH.

Sur une surface de PEG-OH, on observe une adsorption non spécifique de la streptavidine de l'ordre de $11,5 (\pm 2) \text{ ng/cm}^2$. Comme le montre la Figure 38, dans un premier temps une quantité plus importante de streptavidine est adsorbée mais le rinçage suffit à désorber une grande partie des protéines.

Afin de comprendre la structure de l'assemblage biomoléculaire, nous avons étudié l'influence du pourcentage de thiol biotinylé dans la SAM sur la quantité de streptavidine adsorbée. Les couches de SAM à différents pourcentages sont préparées *ex situ* comme précédemment et le suivi de l'assemblage streptavidine/12 est réalisé par QCM-D. La Figure 39 présente l'évolution de la masse surfacique en streptavidine immobilisée en fonction du pourcentage de PEG-biotine utilisé pour préparer la SAM.

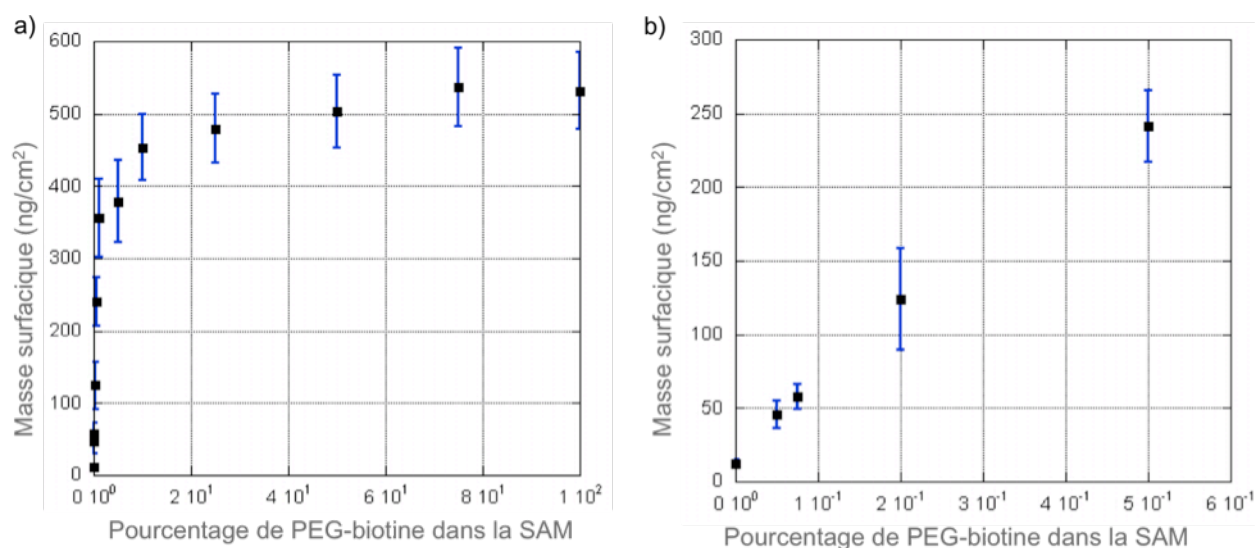


Figure 39 : Graphiques représentant la quantité de streptavidine immobilisée en fonction du pourcentage de PEG-biotine dans la SAM a) de 0 à 100% ; b) zoom de 0 à 0,5%.

On remarque sur la Figure 39a que la quantité maximum de streptavidine immobilisée correspond à environ 10% de PEG-biotine et est quasiment constante au delà de ces 10%. La Figure 39b montre que pour des pourcentages faibles en PEG-biotine, la quantité de streptavidine immobilisée est proportionnelle au pourcentage de thiol biotinylé dans la SAM. Le pourcentage de thiol biotinylé pour lequel la quantité de streptavidine atteint son maximum peut être comparé aux résultats de la littérature. Ceux-ci ont été obtenus en interprétant des données de SPR avec des alcanethiols biotinylés de même nature que celui présentés dans le Schéma 30. W. Knoll montre une saturation de la surface en protéine pour une fraction molaire de 0,10 sur une couche mixte d'alcanethiols présentés dans le Schéma

33.¹³⁷ G. Lopez observe un maximum d'adsorption pour 15% de biotine dans la SAM mixte constitué des alcanethiols présentés dans le Schéma 33.⁵⁷ C. Campbell observe un maximum d'adsorption entre 10 et 50% de biotine et une décroissance pour les pourcentages supérieurs dans le cas d'une SAM mixte composé du thiol biotinylé du Schéma 30 et du thiol PEG-OH.¹²⁰ A faible pourcentage, les groupements biotine seraient exposés vers la solution alors qu'à des pourcentages élevés, les têtes biotinylées induiraient un désordre de la SAM et seraient partiellement repliées dans la couche. Enfin, P. Stayton a déterminé un maximum d'adsorption de streptavidine pour 20 à 30% de thiol biotinylé avec également une diminution d'adsorption pour des fractions molaires plus importantes et ont donné la même explication.⁵⁶ Les différences constatées par rapport à notre travail peuvent être expliquées par la variation de la structure des alcanethiols et par la distribution des thiols biotinylés sur la surface. En effet, dans toutes les publications citées précédemment, les SAM sont assemblées à partir d'alcanethiols présentant un nombre variable de groupements éthylène glycol et contenant des fonctions amides de part et d'autre des OEG qui peuvent induire des liaisons hydrogène intermoléculaires et favoriser la ségrégation de phase. Inversement, les thiols utilisés au cours de notre travail contiennent une liaison amide et une liaison éther ce qui limiterait la formation de liaisons hydrogène. La présence ou non de groupement amide pourrait expliquer la différence de structure des SAM et donc les différences d'immobilisation de la streptavidine.

La plus faible fraction molaire explorée pour la fixation de la streptavidine sur la surface biotinylée est de 0,05%. Le profil de QCM-D de la Figure 40 montre le suivi de la croissance de la couche biomoléculaire pour une telle surface.

¹³⁷ Spinke, J. ; Liley, M. ; Schmitt, F.-J. ; Guder, H.-J. ; Angermaier, L. ; Knoll, W. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 7012-7019.

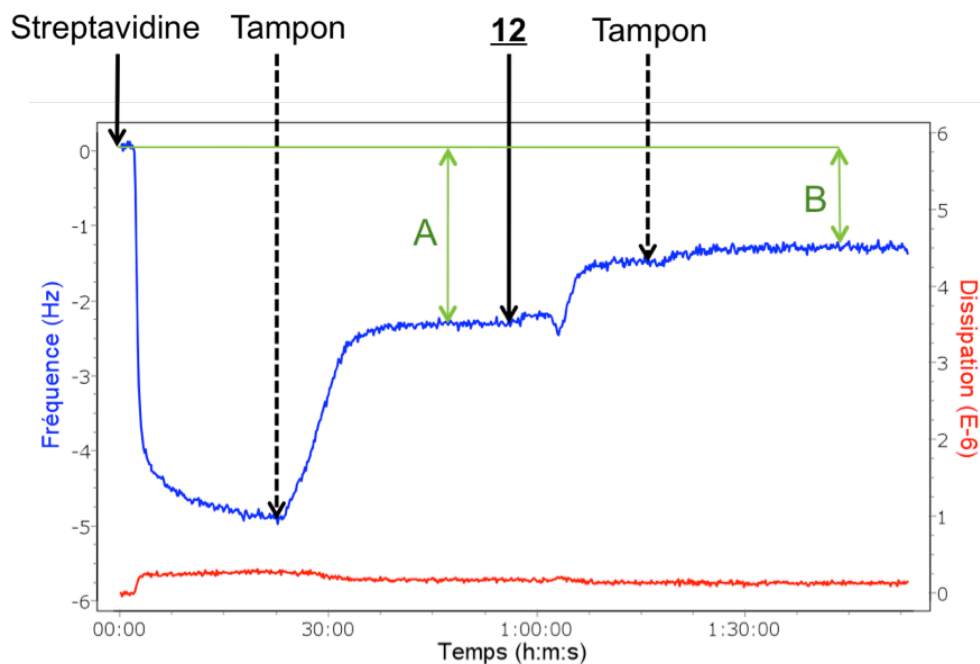


Figure 40 : Profil de QCM-D (fréquence en bleu et dissipation en rouge, 7^{ème} harmonique) obtenu pour la construction de la couche reconnaissante à 0,05% de PEG-biotine.

La quantité de streptavidine immobilisée (A sur la Figure 40) est alors de $45,8 (\pm 9)$ ng/cm^2 . En comparant les valeurs obtenues pour 0% (donc surface de PEG-OH ; $11,5 (\pm 2)$ ng/cm^2) et 0,05%, on peut en déduire que la plupart de la streptavidine adsorbée à 0,05% serait bien liée de façon spécifique à la couche de biotine. En utilisant le taux d'hydratation de 1,2 (donc $38,16 \text{ ng}/\text{cm}^2$ dû à l'immobilisation de la streptavidine), on en déduit une densité de streptavidine de $3830 \text{ molécules}/\mu\text{m}^2$. La distance estimée entre deux molécules de biotine sur une SAM à 0,05% de PEG-biotine (22 nm) est supérieure à la distance entre les deux poches d'une molécule de streptavidine (2 nm, Cf Chapitre I) : la streptavidine ne serait donc liée que par une molécule de biotine sur la surface. Ce résultat est confirmé par le profil de QCM-D (Figure 40) obtenu lors du greffage de la molécule **12** (biotine-cyclodécapeptide-(RGD)₄): après la diminution de fréquence due à l'injection de la solution à $0,1 \mu\text{M}$ de la molécule biotinylée, on observe une faible augmentation de fréquence qui indique une désorption de streptavidine. C. Campbell¹²⁰ a effectivement montré qu'une couche de streptavidine liée par une seule molécule de biotine pouvait être partiellement désorbée en présence d'un excès de biotine en solution. Par ailleurs, il est important de noter pour la suite des expériences que la streptavidine n'étant immobilisée que par un seul site sur la surface, trois sites de liaison peuvent alors fixer des cyclodécapeptides biotinylés. Par conséquent, huit à douze ligands - RGD- sont présentés vers la solution.

Il est possible d'estimer la variation de fréquence due à l'adsorption du ligand **12** sur la surface « SAM biotinylé à 0,05% / streptavidine » à partir de la quantité de streptavidine (3830 molécules/ μm^2). En considérant deux molécules **12** par molécule de streptavidine, on obtient 7660 molécules/ μm^2 ce qui correspond à une couche de ligand **12** de 5,21 ng/cm². L'application de l'équation de Sauerbrey nous permet d'attendre un saut de -0,6 Hz lors de l'adsorption de la molécule **12**. Cette valeur très faible n'est pas détectable, on peut donc considérer que la variation de fréquence mesurée expérimentalement (B sur la Figure 40) est associée à la désorption partielle de la streptavidine et à l'adsorption du ligand **12**. Il en résulte que la variation de fréquence B de -1,6 Hz nous permet d'estimer la quantité de streptavidine restant sur la surface. On en déduit alors que 2368 molécules de streptavidine sont immobilisées par μm^2 . Cette dernière valeur est finalement assez proche de celle calculée théoriquement (2077 molécules/ μm^2) en considérant que chaque thiol biotinylé fixe une streptavidine dans la SAM à 0,05%.

En conclusion, cette méthode de greffage des ligands -RGD- par couplage affiné permet de contrôler la quantité de ligand immobilisé. Il est cependant important de noter pour la suite des études que, quelque soit la dilution de la streptavidine sur la surface, on obtient toujours des clusters de ligands -RGD-. La streptavidine est en effet liée à deux ou trois châssis cyclodécapeptidiques qui présentent chacun quatre ligands -RGD-. Les résultats obtenus par les différentes techniques ont permis de bien caractériser la couche biomoléculaire même s'il reste des imprécisions, notamment sur les taux d'hydratation des différentes couches. Ces problèmes pourraient peut-être être résolus en utilisant de façon plus approfondie les techniques optiques de caractérisation de surfaces et d'interfaces. Les propriétés de reconnaissance des surfaces préalablement fonctionnalisées par les ligands -RGD- ont été ensuite évaluées par des tests d'adhésion cellulaire suivis par QCM-D.

2. Tests d'adhésion cellulaire

Différentes conditions expérimentales utilisées pour ces tests d'adhésion cellulaire ont été optimisées afin de faciliter l'interprétation des résultats. Les suspensions cellulaires sont préparées à une concentration de 100 000 cellules/mL dans du milieu de culture sans sérum. En effet, ce dernier contient différentes protéines présentant la séquence -RGD- qui entrerait alors en compétition avec les motifs -RGD- de la surface. Les tests durent moins de trois heures pour éviter la sécrétion de la matrice extracellulaire par les cellules adhérentes qui

interféreraient alors avec l'interaction à étudier. Les signaux de QCM-D utilisés pour caractériser l'adhésion cellulaire concernent les six premières harmoniques impaires. La plupart des expériences d'adhésion cellulaire ont été réalisées dans les modules en flux mais quelques expériences ont été exécutées dans les modules en « mode statique ».

a. Tests d'adhésion cellulaire sur une surface présentant les ligands -RGD- immobilisés sur une SAM mixte contenant 10 % de PEG-biotine

Les propriétés de reconnaissance des surfaces, réalisées par des tests d'adhésion cellulaire et présentés dans ce paragraphe ont été évaluées sur des SAMs à 10 % de thiol biotinylé, afin d'avoir une quantité importante de ligand -RGD- pour optimiser les processus d'adhésion et d'étalement cellulaire. Immédiatement après la construction de l'assemblage de la couche de reconnaissance, le milieu de culture « DMEM » (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sans sérum est injecté dans la chambre de mesure de la QCM-D jusqu'à obtention d'une ligne de base stable. Ce changement de milieu entraîne une diminution de fréquence d'environ 2 Hz et une augmentation de dissipation d'environ $0,8 \cdot 10^{-6}$. Le milieu de culture contient les nutriments nécessaires à la survie des cellules comme du glucose, des sels, des vitamines et des acides aminés. Ces légères variations de fréquence et de dissipation peuvent donc être dues au changement de viscosité de la solution par rapport au PBS (tampon dans lequel a été formé la couche) mais également à l'incorporation d'ions dans la couche préalablement formée.

La suspension cellulaire de HEK-β3 à 100 000 cellules/mL dans le DMEM est ensuite injectée dans la chambre de mesure avec un flux constant de 50 μL/min jusqu'à stabilisation du signal. La chambre de mesure est alors rincée au DMEM. L'enregistrement des signaux de fréquence et de dissipation tout au long de l'expérience permet de suivre l'adhésion puis l'étalement des cellules sur la surface. La Figure 41 présente une expérience d'adhésion cellulaire sur une surface reconnaissante présentant le ligand **12** suivie par QCM-D.

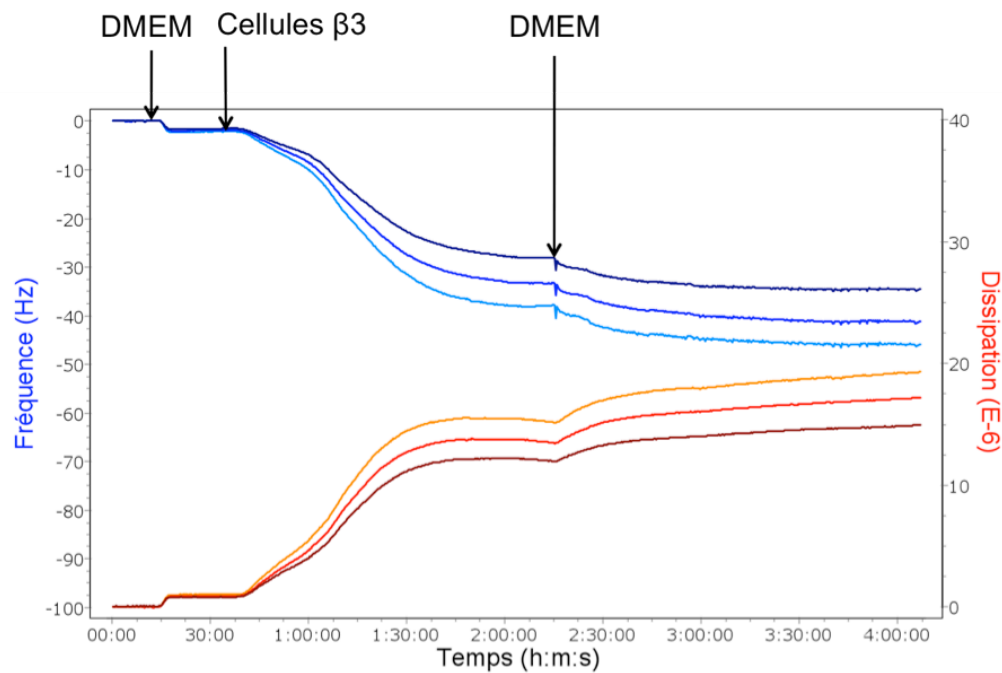


Figure 41 : Suivi de l'adhésion cellulaire par QCM-D sur une surface à 10 % de PEG-biotine et présentant le ligand 12. Les variations de fréquence sont présentées en bleues et les variations de dissipation en rouge, sur les 7^{ème}, 9^{ème} et 11^{ème} harmoniques (du plus clair au plus foncé).

Lors de l'injection des cellules dans la chambre de mesure, on observe, pour la neuvième harmonique, une diminution de fréquence de 31,4 Hz et une augmentation de dissipation de $12,4 \cdot 10^{-6}$. Au vu de la forte variation de dissipation et de la différence de valeur en fonction des harmoniques, il y a fixation d'une couche visqueuse sur la surface. On peut donc conclure que les cellules ont bien adhéré sur la surface recouverte de ligand RGD. La faible variation des signaux après le rinçage au DMEM montre que les cellules sont solidement attachées à la surface. Afin de conclure sur la spécificité ou non de l'adhésion, il est nécessaire d'effectuer des comparaisons. Ainsi, la Figure 42 présente le processus d'adhésion cellulaire de HEK-β3 pour différentes surfaces :

- RGD, présenté précédemment.
- RAD, la couche de biomolécules présente la séquence RAD 13, non reconnue par l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.
- SA, la couche à 10 % de PEG biotine est fonctionnalisée avec la streptavidine mais aucun ligand biotinylé n'est mis en contact avec la surface. La surface est donc ici recouverte d'une couche de streptavidine.
- PEG-OH, la surface ne présente que des alcanethiols PEG-OH.

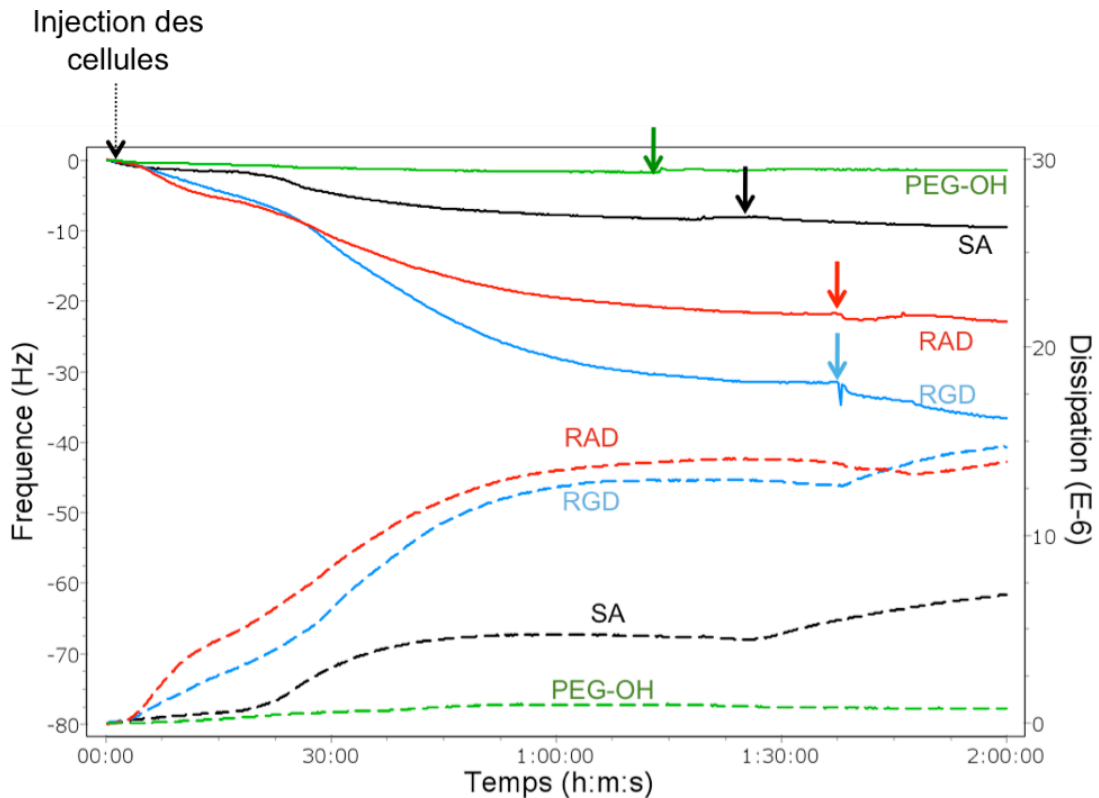


Figure 42 : Superposition des profils de QCM-D (9^{ème} harmonique) enregistrés lors de l'adhésion cellulaire. Les flèches correspondent au rinçage de la chambre de mesure avec le DMEM. Les variations de fréquence sont présentées en traits pleins et les variations de dissipation en traits pointillés.

La Figure 42 présente les variations de fréquence et de dissipation pour la 9^{ème} harmonique ($F = 45$ MHz) sur différentes surfaces entre l'injection des cellules dans la chambre de mesure et la fin du rinçage au DMEM. On observe tout d'abord que les signaux obtenus sur une surface de PEG-OH ne varient presque pas, il n'y a donc pas d'adhésion non spécifique sur cette surface (en vert). Il est connu que la QCM-D ne détecte pas les cellules uniquement déposées sur la surface par sédimentation⁸⁶. La présence des cellules à proximité de la surface ne suffit pas à ce qu'elles soient détectées. Les OEG créent une couche d'eau entre la surface et les cellules ce qui maintient ces dernières à une distance supérieure à la pénétration de l'onde électroacoustique. Les propriétés anti-adhésives des groupements éthylène glycol sont bien confirmées dans notre cas.

Le profil obtenu pour une surface de RGD (en bleu) est également comparé à celui obtenu pour une surface non spécifique de RAD (en rouge). Les deux surfaces ne diffèrent que par le résidu glycine qui est remplacé par un résidu β -alanine dans la molécule -RAD-. L'injection des cellules HEK- β 3 sur cette surface montre des variations de fréquence et dissipation comparables à celles observées sur la surface RGD. Un tel résultat traduit une forte adhésion non spécifique des cellules sur la surface RAD. Il a en effet été montré que la

technique de QCM n'est sensible qu'aux cellules fixées sur la surface¹³⁸ qui sont donc en contact proche de la surface du résonateur (distance surface cellule de 10 à 20 nm)¹³⁹. Une étude d'adhésion cellulaire sur une surface présentant une couche dense de streptavidine (immobilisée sur une surface contenant 10 % de PEG-biotine) est également présentée ici (en noir). Les signaux de fréquence et de dissipation obtenus lors de l'adhésion des cellules sur la streptavidine représentent 30 à 35 % de ceux obtenus sur RGD. Cette étude permet de montrer que la streptavidine est responsable, au moins en partie, de l'adhésion non spécifique des cellules sur la surface RAD. La plus grande adhésion non spécifique obtenue sur la surface RAD par rapport à celle obtenue sur la surface SA peut être expliquée par le fait que la molécule **13** est globalement chargée négativement alors que la streptavidine est globalement neutre.

Afin de distinguer l'adhésion spécifique des cellules sur une surface présentant les ligands RGD **12** de l'adhésion non spécifique des cellules sur la séquence RAD **13**, les courbes de la variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence sont présentées sur la Figure 43.

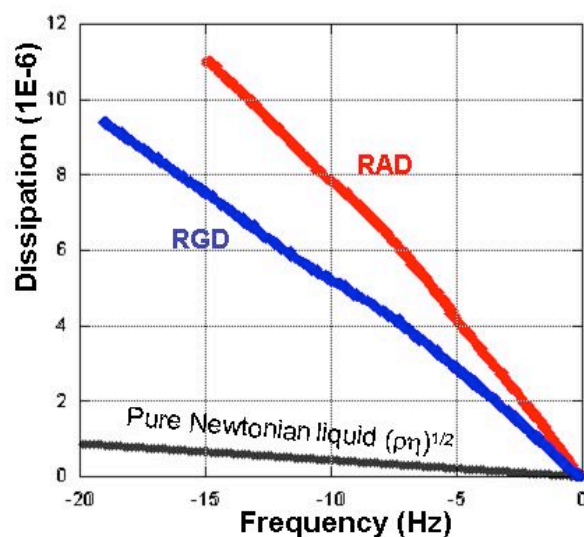


Figure 43 : Variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence lors de l'adhésion cellulaire sur une surface présentant les ligands RGD (en bleu) et sur une surface présentant les molécules RAD (en rouge) avec 10 % de PEG-biotine dans la SAM.

¹³⁸ Heitmann, V. ; Wegener, J. *Anal Chem.* **2007**, 79, 3392-3400.

¹³⁹ Lord, M.S. ; Modin, C. ; Foss, M. ; Duch, M. ; Simmons, A. ; Pedersen, F.S. ; Milthorpe, B.K. ; Besenbacher, F. *Biomaterials* **2006**, 27, 4529-4537.

Les changements de densité (ρ) et de viscosité (η) d'un liquide newtonien déposé sur un cristal de quartz produisent des variations de fréquence et de dissipation même en l'absence d'interaction avec la surface. M. Rodahl et B. Kasemo⁷⁵ ont calculé pour la technique de QCM-D et à partir des premiers travaux menés par K. Kanazawa et J. Gordon¹⁴⁰, les variations de fréquence et dissipation induites par les changements de densité et de viscosité d'un liquide newtonien :

$$\Delta F = -\frac{1}{2\pi t_q \rho_q} \sqrt{\pi F_0 \rho_l \eta_l} \quad \text{et} \quad \Delta D = \frac{1}{t_q \rho_q} \sqrt{\frac{\rho_l \eta_l}{\pi F_0}}$$

Avec t_q l'épaisseur du quartz ; ρ_q la densité du cristal de quartz ; ρ_l la densité du liquide ; η_l la viscosité du liquide et F_0 la fréquence de résonance.

On remarque que les deux paramètres ΔF et ΔD varient proportionnellement à $(\rho_l \eta_l)^{1/2}$ ce qui conduit à l'obtention d'une droite pour la courbe $\Delta D = f(\Delta F)$, dont la pente est égale à $-2/F_0$ (la droite noire de la Figure 43 est tracé pour $F_0 = 45$ MHz). K. Marx explique qu'une telle variation est celle attendue pour des cellules qui ne présentent pas d'attachement significatif sur la surface du résonateur. Le fait que les cellules non adhérentes miment le comportement d'un liquide dont la densité ρ et la viscosité η sont croissantes se justifie par l'augmentation progressive du nombre de cellules sédimentées à l'interface.¹⁴¹

Les quarante premières minutes des données expérimentales, correspondant à la première phase de l'adhésion cellulaire, sur la Figure 42 sont exploitées pour tracer les courbes (Figure 43) de la variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence pour les surfaces RGD (en bleu) et RAD (en rouge). En se plaçant dans la phase initiale du processus d'adhésion cellulaire, on obtient ainsi des droites. La pente de ces droites est largement supérieure à celle obtenue dans le cas du liquide newtonien, ce qui traduit une plus forte augmentation de la dissipation d'énergie. K. Marx a fait la même observation avec des cellules endothéliales sur des surfaces d'or et a expliqué cet accroissement de la variation de dissipation par l'attachement ferme des cellules à la surface lié au processus d'adhésion.¹⁴¹ On peut ensuite comparer les représentations $\Delta D = f(\Delta F)$ pour les deux surfaces, RGD et RAD. La pente obtenue pour une surface RGD est inférieure à celle obtenue pour une surface RAD ce qui montre une différence de comportement des cellules adhérentes. M. Rodahl⁷⁸ a démontré que plus la masse déposée sur le quartz était rigide et compacte, plus le rapport $\Delta D/\Delta F$ était faible. Dans notre cas, si on compare les énergies de dissipation pour les deux expériences à

¹⁴⁰ Kanazawa, K.K. ; Gordon, J.G. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1771-1772.

¹⁴¹ Marx, K.A. *Springer Ser. Chem. Sens. Biosens.* **2007**, 5, 371-424.

une même valeur de fréquence, on obtient une valeur plus élevée sur RAD que sur RGD. La couche de cellules est donc plus dissipative sur RAD que sur RGD. Ce résultat peut être expliqué par des cellules plus rondes sur la surface présentant les molécules RAD qui ne peuvent pas s'étaler puisqu'elles ne sont liées que par des interactions non spécifiques. A l'inverse, les cellules adhèrent de façon spécifique sur la surface présentant les ligands RGD ce qui conduit à un étalement plus marqué des cellules. Elles sont ainsi plus solidaires des oscillations du quartz et forment une couche moins dissipative d'énergie.

Nous avons ensuite étudié l'influence du taux de greffage en ligand **12** (RGD) ou en molécule **13** (RAD) sur le processus d'adhésion cellulaire.

b. Diminution du pourcentage de PEG-biotine

L'étude précédente portait sur une surface fonctionnalisée à 10% de PEG-biotine dans la SAM. Un tel pourcentage de biotine dans la couche conduit à l'adsorption d'une couche de streptavidine à saturation. La diminution du pourcentage de biotine dans la SAM permet alors d'une part de diminuer la quantité de streptavidine immobilisée et d'autre part de diminuer le nombre de ligands immobilisés sur la surface (Cf Chapitre 3, paragraphe I-1-b). En diminuant le densité de streptavidine sur la surface, l'adhésion non spécifique des cellules devrait diminuer. On peut alors espérer améliorer l'adhésion spécifique des cellules sur les surfaces présentant le ligand de reconnaissance par rapport aux surfaces de contrôle.

Nous avons testé l'adhésion cellulaire des cellules HEK-β3 sur des plateformes Au/SAM/streptavidine/**12** ou **13**, dont les SAM contiennent 0,5 %, 0,075 % ou 0,05 % de PEG-biotine. La Figure 44 présente les profils de QCM-D caractéristiques de l'adhésion cellulaire sur les surfaces avec ces différents pourcentages.

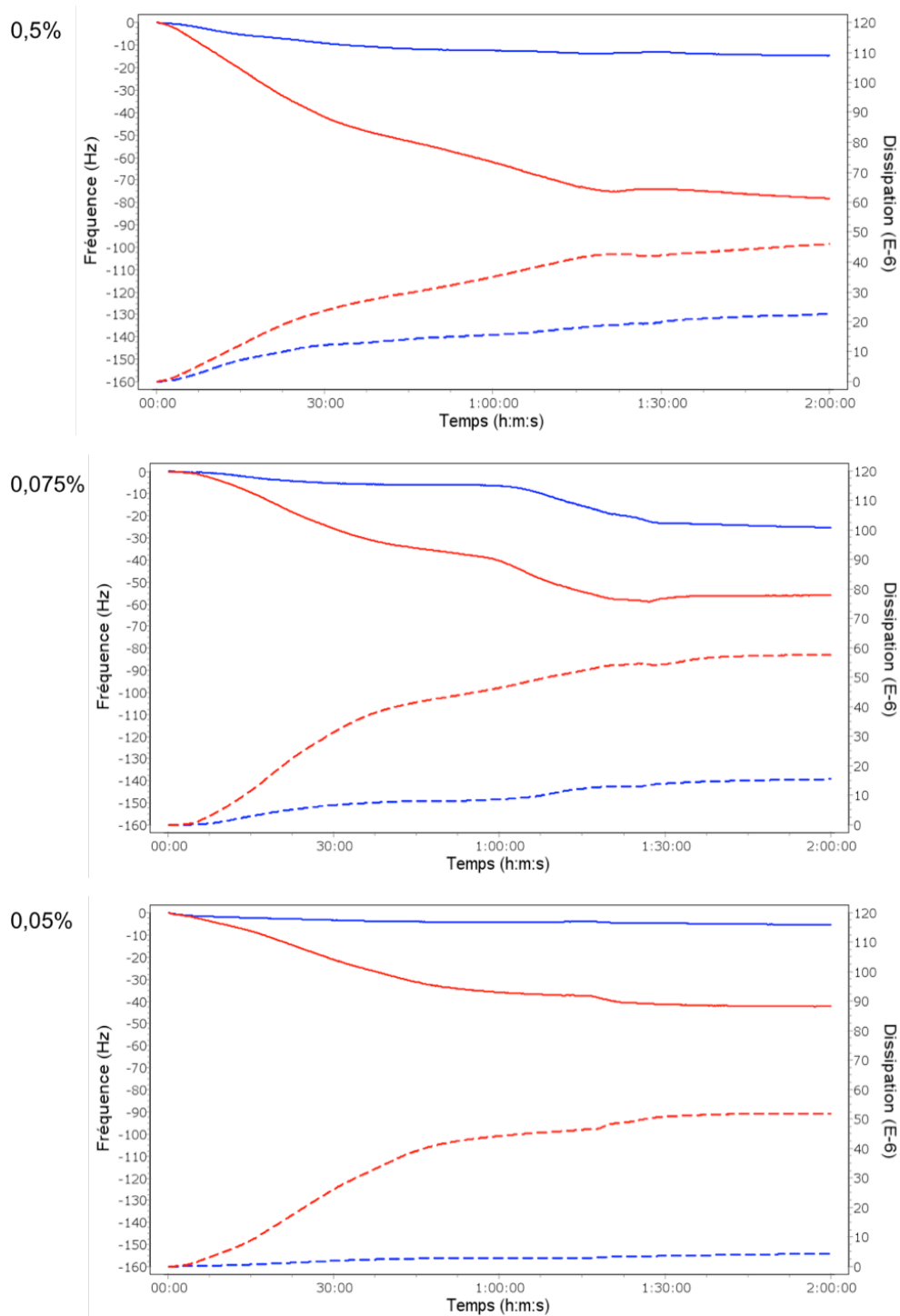


Figure 44 : Evolution des signaux de fréquence (traits pleins) et de dissipation (traits pointillés) pour la 9^{ème} harmonique, caractérisant l'adhésion cellulaire sur des surfaces présentant les molécules 12 (ligand - RGD- ; en rouge) ou 13 (peptide -RAD- ; en bleu) avec différents pourcentage de PEG-biotine dans la couche.

La Figure 44 permet de mettre en évidence les variations des signaux de fréquence et de dissipation obtenus lors de l'adhésion des cellules sur les surfaces pour des pourcentages de PEG-biotine dans la couche de 0,5% à 0,05%. Un problème de reproductibilité des signaux lors de l'adhésion cellulaire a été observé au cours de ces expériences dû sans doute au mode

d'injection des cellules. En effet, malgré l'agitation des suspensions cellulaires, nous sommes confrontés à des problèmes de sédimentation dans les flacons de stockage qui conduisent à la formation d'agrégats de cellules qu'il est difficile de redisperser. Les suspensions cellulaires injectées ne sont donc pas homogènes et identiques d'un jour à l'autre. Afin d'établir des comparaisons de l'adhésion des cellules sur les surfaces RGD et RAD, on évalue simultanément le comportement des cellules sur deux surfaces RGD et sur deux surfaces RAD sur des SAM présentant le même pourcentage de PEG-biotine. Les résultats présentés ici sont une moyenne des deux expériences similaires effectuées en parallèle le même jour. Les différences observées entre une surface RGD et une surface RAD ne doivent donc être dues qu'à une différence de comportement des cellules sur les surfaces. La diminution de la densité de greffage sur la surface conduit à des différences de variations de fréquence et de dissipation de plus en plus importantes entre la surface RGD et la surface RAD. Plus le pourcentage de PEG-biotine dans la couche diminue, plus la variation des signaux pour une surface RAD est faible par rapport à celle pour une surface RGD. Cette tendance indique une plus forte réponse d'adhésion sur une surface RGD que sur une surface RAD à faible pourcentage. Parallèlement, on observe également que les variations de fréquence et de dissipation diminuent quand le pourcentage de PEG-biotine dans la SAM et donc la quantité de ligands sur la surface diminuent. Il y aurait donc moins de cellules immobilisées sur la surface et elles seraient moins étalées. Dans la littérature, G. Whitesides¹⁴² avec des SAM et H. Kessler^{143,144} avec des nanoparticules immobilisées sur des surfaces, ont montré que le nombre de cellules sur la surface et leur étalement étaient dépendants de la concentration en ligand RGD. J. Redepenning⁷⁹, quant à lui, a montré que plus il y avait de cellules adhérentes sur la surface, plus la variation de fréquence était importante.

Afin d'étudier l'impact du nombre de cellules dans la chambre de mesure sur la réponse en QCM-D avec le système d'immobilisation envisagé dans ce travail, nous avons réalisé des expériences d'adhésion cellulaire sur la surface RGD à 0,05% de PEG-biotine dans la SAM. On utilise une chambre de mesure ouverte qui permet d'injecter une solution contenant un nombre connu de cellules. La Figure 36 présente l'évolution des valeurs maximales de fréquence et de dissipation en fonction du nombre de cellules injectées dans la chambre de mesure.

¹⁴² Roberts, C. ; Chen, C.S. ; Mrksich, M. ; Martichonok, V. ; Ingber, D.E. ; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6548-6555.

¹⁴³ Cavalcanti-Adam, E.A. ; Micoulet, A. ; Blümmel, J. ; Auernheimer, J. ; Kessler, H. ; Spatz, J.P. *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 219-224.

¹⁴⁴ Cavalcanti-Adam, E.A. ; Volberg, T. ; Micoulet, A. ; Kessler, H. ; Geiger, B. ; Spatz, J.P. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2964-2974.

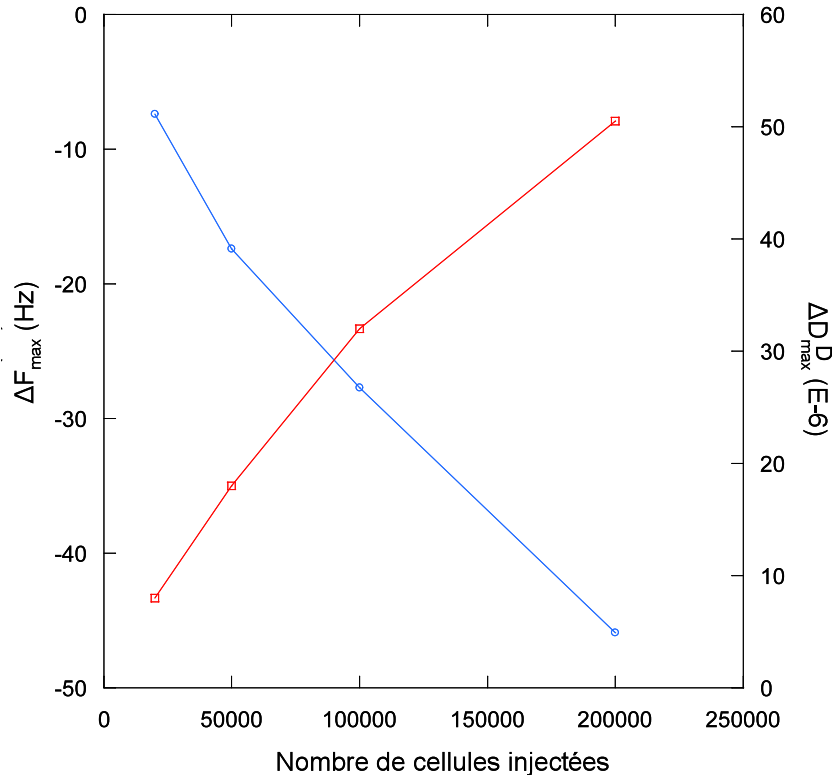


Figure 45 : Evolution des valeurs maximales de fréquence (en bleu) et de dissipation (en rouge) en fonction du nombre de cellules injectées dans la chambre de mesure. La SAM contient 0,05% de PEG-biotine et est fonctionnalisée par le cyclodécapeptide 12 (surface RGD).

On observe sur la Figure 45 que l'augmentation du nombre de cellules déposées sur la surface provoque une diminution de la fréquence et une augmentation de la dissipation. Plus le nombre de cellules adhérentes sur la surface est important, plus la quantité de matière déposée sur le quartz et sondée par l'onde électroacoustique est importante et plus la variation des signaux de fréquence et de dissipation est élevée. Ces résultats sont bien en accord avec la littérature.

Afin de comparer et d'analyser de façon plus approfondie l'étalement des cellules aux différents pourcentages de PEG-biotine, nous avons utilisé la représentation en $\Delta D = f(\Delta F)$ (Figure 46).

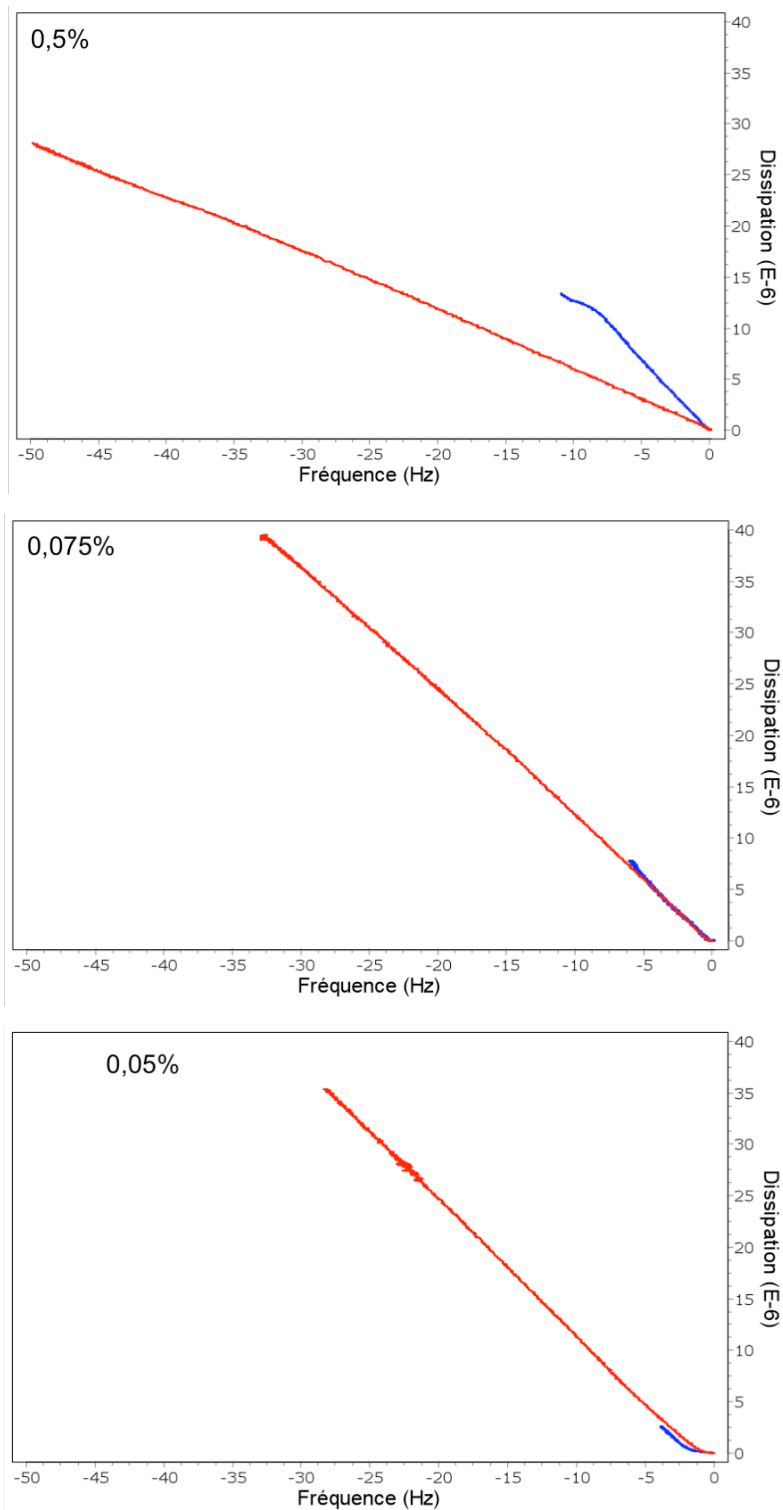


Figure 46 : Variation de dissipation en fonction de la variation de fréquence lors de l'adhésion cellulaire sur une surface présentant la molécule 12 (ligand -RGD- ; en rouge) ou la molécule 13 (ligand -RAD- ; en bleu) avec différents pourcentages de PEG-biotine dans la SAM.

La Figure 46 permet de mettre en évidence les domaines de variations des signaux de fréquence et de dissipation obtenus lors des quarante premières minutes de l'adhésion des cellules sur les surfaces. Plus le pourcentage de PEG-biotine dans la couche diminue, plus les

domaines de variation des signaux sur une surface RAD et sur une surface RGD sont différents, donc plus la spécificité de l'adhésion augmente. Cependant, cette représentation fait apparaître comme précédemment, une certaine disparité dans les valeurs maximales obtenues qui correspondent ici aux extrémités des droites. Afin de normaliser les données de chaque expérience, nous avons calculé le rapport des valeurs de fréquence et de dissipation obtenues à 40 minutes d'adhésion sur une surface RGD et sur une surface RAD indépendamment pour la fréquence et pour la dissipation (Figure 47).

$$\frac{\Delta F_{\max}^{RAD}}{\Delta F_{\max}^{RGD}} = f(x_{PEG-biotine}) \quad \text{et} \quad \frac{\Delta D_{\max}^{RAD}}{\Delta D_{\max}^{RGD}} = f(x_{PEG-biotine})$$

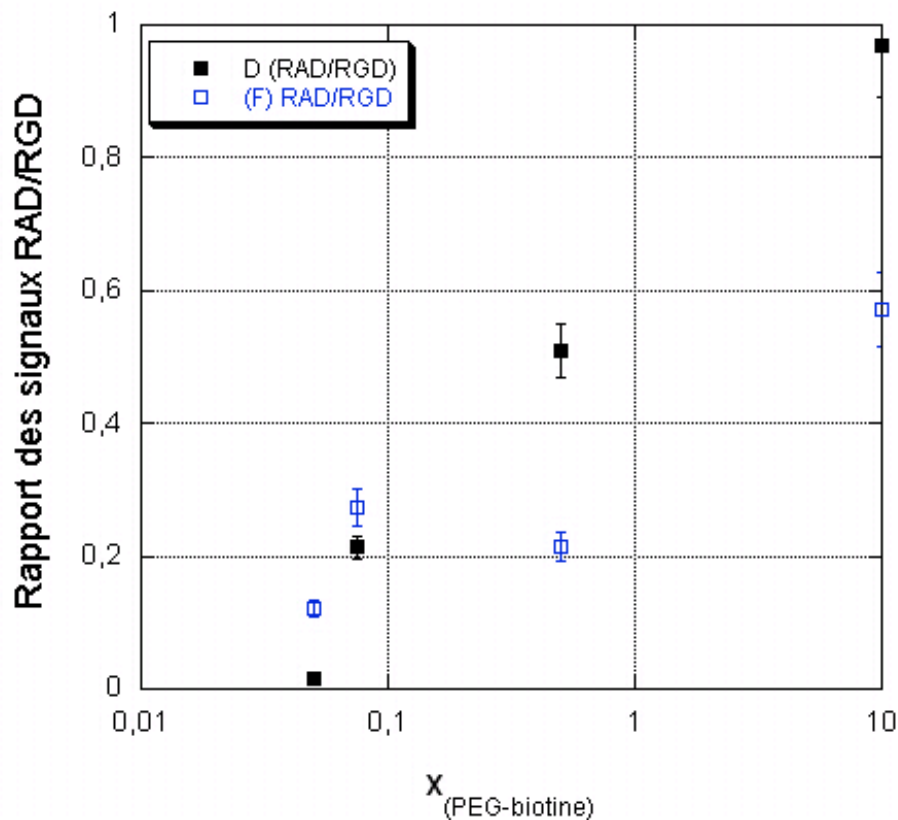


Figure 47 : Variation du rapport de fréquence (carrés vides) et de dissipation (carrés pleins) mesurés sur les profils de QCM-D à 40 minutes d'adhésion, pour une surface RAD et une surface RGD en fonction de la fraction molaire de PEG-biotine dans la SAM.

Le rapport des valeurs obtenues à 10 % est le plus élevé, et diminue globalement avec le pourcentage de PEG-biotine et donc avec la quantité de ligand. La valeur ainsi obtenue à 0,05% est la plus faible indiquant clairement des variations de fréquence et de dissipation beaucoup plus élevées sur une surface RGD que sur une surface RAD. Cette étude et cette présentation des résultats nous permet ainsi de conclure que la diminution de la fraction

molaire en PEG-biotine dans la SAM permet de limiter l'adhésion non spécifique au profit de l'adhésion spécifique entre les cellules HEK-β3 et les ligands **12**.

Il est intéressant de noter qu'une diminution de fréquence et une augmentation de dissipation peuvent être associées à un plus grand nombre de cellules adhérentes sur la surface mais aussi à des cellules plus étalées qui occupent donc une plus grande fraction de surface^{83,139}. L'étalement des cellules peut être évalué à partir de la pente des courbes $\Delta D = f(\Delta F)$. Les pentes des droites obtenues à la Figure 46 pour une surface RGD, permettent de tracer le graphique suivant (Figure 48) :

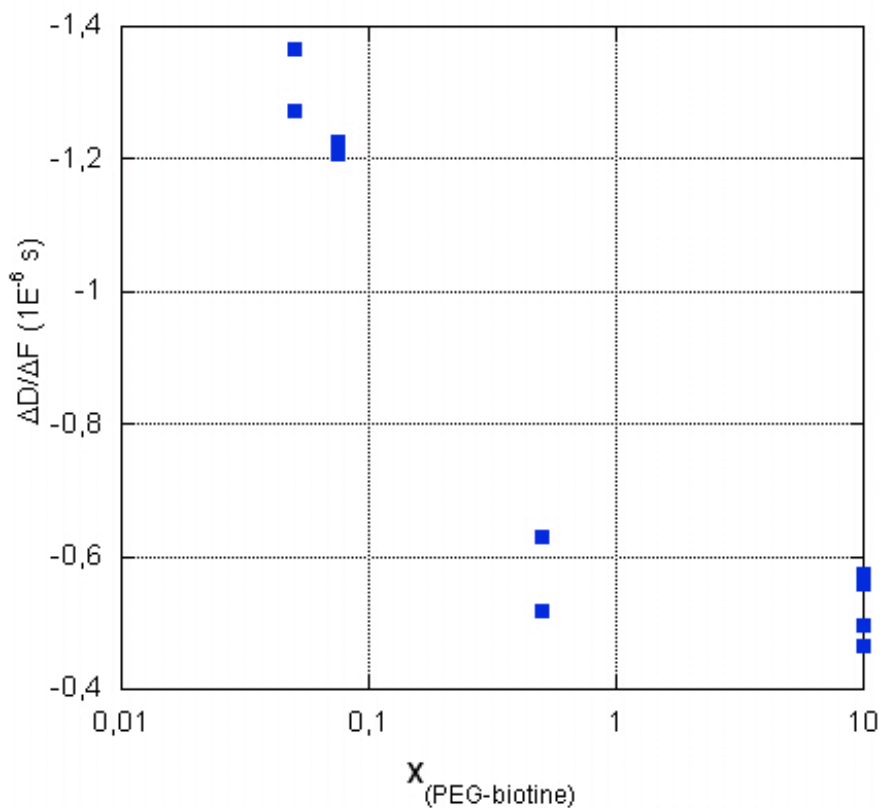


Figure 48 : Evolution de la pente de la droite D/F obtenues lors de l'adhésion cellulaire en fonction du pourcentage de PEG-biotine dans la SAM.

L'évolution de la pente des courbes $\Delta D = f(\Delta F)$ en fonction de la fraction molaire de PEG-biotine dans la couche permet de comparer directement la réponse des cellules en fonction de la densité de RGD. La pente $\Delta D/\Delta F$ reflète l'étalement des cellules sur la surface : plus la pente est forte, plus la dissipation est élevée ce qui peut être corrélé à des cellules moins étalées sur la surface. On remarque que plus la densité de RGD sur la surface est importante, plus la pente de la droite $\Delta D = f(\Delta F)$ diminue, ce qui indique un étalement plus important des cellules. A 0,05% les cellules sont donc moins étalées qu'à 10 %. L'espacement

des ligands sur une surface à 0,05% de PEG-biotine a été estimé. Dans le paragraphe précédent la détermination à partir des données expérimentales obtenues par électrochimie de l'espacement entre deux molécules de PEG-biotine a été évalué à 22 nm. On a également montré qu'à ce pourcentage de PEG-biotine dans la SAM, la streptavidine n'était immobilisée que par un seul site sur la surface. Elle possède donc trois sites de liaison qui peuvent être occupés par des cyclodécapeptides. Huit à douze ligands -RGD- sont alors présentés vers la solution au récepteur cellulaire, chaque cluster étant espacé d'environ 22 nm.

S. Massia²³ a couplé des ligands RGD-NH₂ sur une surface préalablement silylée. Il a ainsi déterminé un espacement maximal entre les ligands de 440 nm pour observer l'étalement des cellules et de 140 nm pour observer la formation de contacts focaux. W. Murphy⁴⁸ a utilisé des ligands -RGD- linéaires greffés sur une SAM par click-chemistry et a déterminé qu'un espacement maximal entre les ligands de 36 nm est nécessaire à l'adhésion cellulaire. De plus, un espacement de 11 nm s'avère nécessaire à l'observation d'un maximum d'étalement des cellules sur la surface. L. Griffith¹⁴⁵ a étudié des polymères en étoiles qui présentent des clusters de ligands -RGD-. Il a été déterminé, pour ces systèmes, les espacements seuils à l'observation de l'adhésion focale et de la formation de fibres cellulaires : 60 nm pour des clusters de 9 -RGD-, 9 nm pour des clusters de 5 -RGD- et un espacement inférieur à 6 nm pour des ligands -RGD- uniques. Ces valeurs de la littérature permettent de donner un ordre de grandeur des distances maximales requises pour l'adhésion cellulaire sur des surfaces spécifiques. Elles sont en revanche difficiles à comparer du fait des différences de nombreux paramètres : technique d'immobilisation du ligand, nature du ligand (linéaire, cyclique, multivalent) ou lignée cellulaire étudiée. Dans notre cas, il n'est, de toute façon, pas possible de déterminer les concentrations minimales nécessaires à l'adhésion et à l'étalement cellulaire. En effet, en diminuant le pourcentage de PEG-biotine dans la SAM, la caractérisation de la couche et la détection du faible nombre de cellules seraient difficiles en raison de la sensibilité de la technique de détection. Par ailleurs, il est nécessaire de rappeler que le système d'immobilisation par l'intermédiaire de la streptavidine induit la formation de clusters de huit à douze ligands -RGD-.

¹⁴⁵ Maheshwari, G. ; Brown, G. ; Lauffenburger, D.A. ; Wells, A. ; Griffith, L.G. *J. Cell Science* **2000**, *113*, 1677-1686.

c. Etude à 0,05% de PEG-biotine

Afin de visualiser le processus d'adhésion cellulaire sur une surface RGD au plus petit pourcentage étudié de PEG-biotine dans la SAM (0,05%), des études ont été menées par microscopie optique.

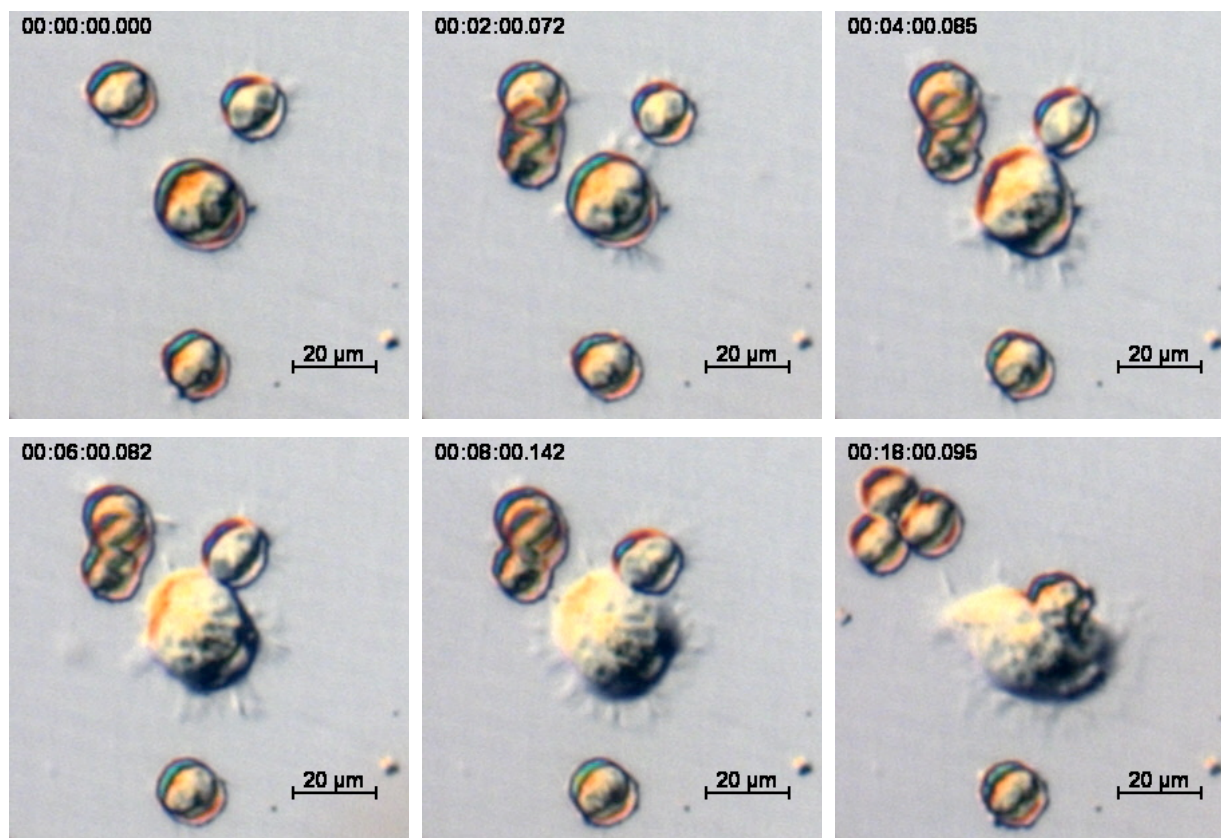


Figure 49 : Images de suivi de l'adhésion cellulaire prises au microscope sur une surface présentant le ligand -RGD- sur une SAM à 0,05% de PEG-biotine. Les temps indiqués (0, 2, 4, 6, 8 et 18 minutes) sont relatifs au temps de début d'enregistrement du film.

Sur la Figure 49, la première image montre des cellules rondes venant d'adhérer sur la surface. La succession des images suivantes permet de visualiser le processus d'étalement de la cellule. Le processus d'adhésion et d'étalement des cellules est très rapide puisqu'une dizaine de minutes seulement est nécessaire entre le contact avec la surface et l'obtention d'une morphologie étalée. Les cellules apparaissent rondes sur la surface au début du processus (première photo de la Figure 49) et adoptent ensuite une morphologie aplatie et allongée avec des extensions de la membrane (dernière photo de la Figure 49). Le diamètre d'une cellule ronde qui vient d'adhérer sur la surface est d'environ 15 µm. Sur la dernière image acquise, les cellules étalées ont un diamètre moyen de 31 µm et une surface de 730 (± 300) µm². Ces valeurs sont imprécises puisque lorsque les cellules sont étalées, il devient

difficile de discerner les contours de la membrane, malgré la technique utilisée (contraste interférentiel différentiel) qui renforce les contrastes entre la surface et les objets. La comparaison entre la cinquième et la sixième image (à 8 et 18 minutes) montre un léger déplacement de la cellule grâce aux filopodes qui explorent la surface.

Ces résultats montrent que les cellules sont étalées mais qu'elles n'adoptent pas une morphologie fortement étalée. Ils confirment ceux obtenus précédemment par QCM-D qui montrent que les cellules ne peuvent pas complètement s'étaler sur une surface RGD à faible pourcentage de PEG-biotine dans la couche.

Nous avons montré au paragraphe précédent que les résultats d'adhésion cellulaire obtenus sur une surface à 0,05% sont satisfaisants puisqu'ils permettent de limiter l'adhésion non spécifique et de différencier les surfaces positives des surfaces négatives. Le graphique de la Figure 50 rappelle les courbes de QCM-D obtenues sur une surface à 0,05 % de PEG-biotine présentant les ligands **12** (en rouge) ou les ligands **13** (en bleu).

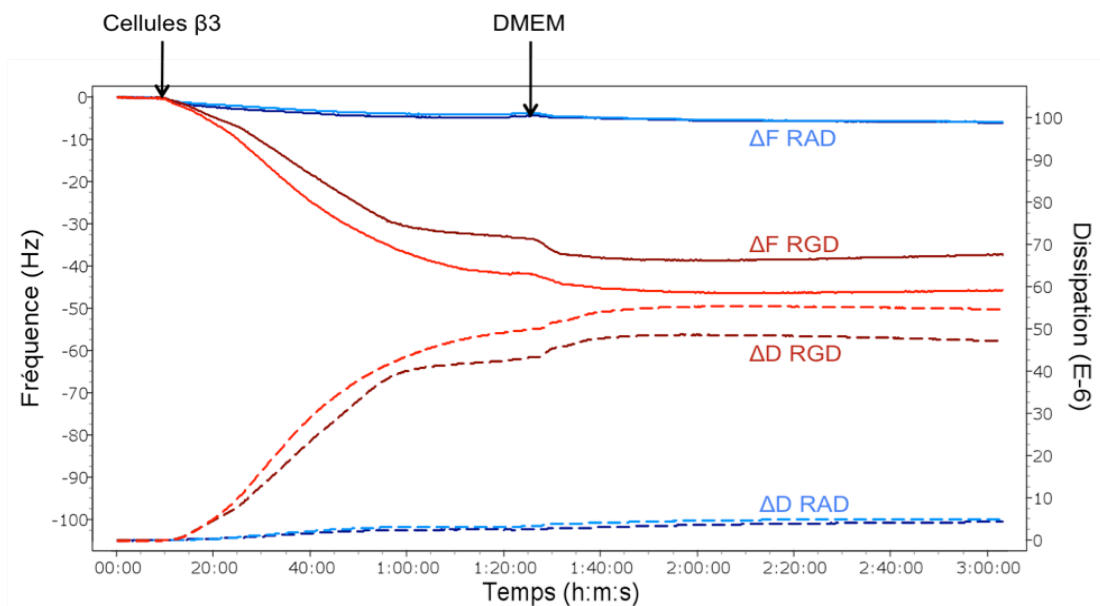


Figure 50 : Suivi de l'adhésion cellulaire par QCM-D sur une surface à 0,05 % de PEG-biotine et présentant le ligand **12 (en rouge) ou le ligand **13** (en bleu).**

Les variations de fréquence et de dissipation entre la surface RGD et la surface RAD sont bien différenciées. Après rinçage, la moyenne sur les deux expériences des variations de fréquence sont de -41,3 Hz pour la surface RGD et de -5,8 Hz pour la surface RAD et les variations de dissipation de $50,8 \cdot 10^{-6}$ pour la surface RGD et de $4,7 \cdot 10^{-6}$ pour la surface RAD. Les signaux de fréquence et de dissipation obtenus sur la surface de contrôle représentent 10 à

15 % des signaux obtenus sur la surface de reconnaissance. Malgré une légère adsorption non spécifique sur la surface RAD, l'adhésion spécifique sur la surface RGD est bien différenciée sur une surface contenant 0,05% de PEG-biotine dans la SAM. Les faibles variations de fréquence et de dissipation obtenues sur la surface RAD peuvent être attribuées à un faible taux de cellules sur la surface en comparaison des signaux obtenus sur la surface RGD.

A ce taux de greffage des ligands, un autre test de contrôle a été réalisé. Des cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_V\beta_1$ (appelées cellules β_1) qui ne reconnaît pas le motif -RGD- sont injectées sur la surface RGD. Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions d'injection des cellules que précédemment. Cependant, les cellules β_1 , utilisées durant cette période, étaient contaminées par des microorganismes rendant ainsi les résultats obtenus difficilement interprétables. Cette expérience avait été auparavant réalisée en mode statique, ce sont ces résultats qui sont présentés ici (Figure 51). On utilise dans ce cas des modules ouverts, sans fluide, qui permettent d'injecter les cellules directement sur la surface à l'aide d'une micropipette (Cf partie expérimentale).

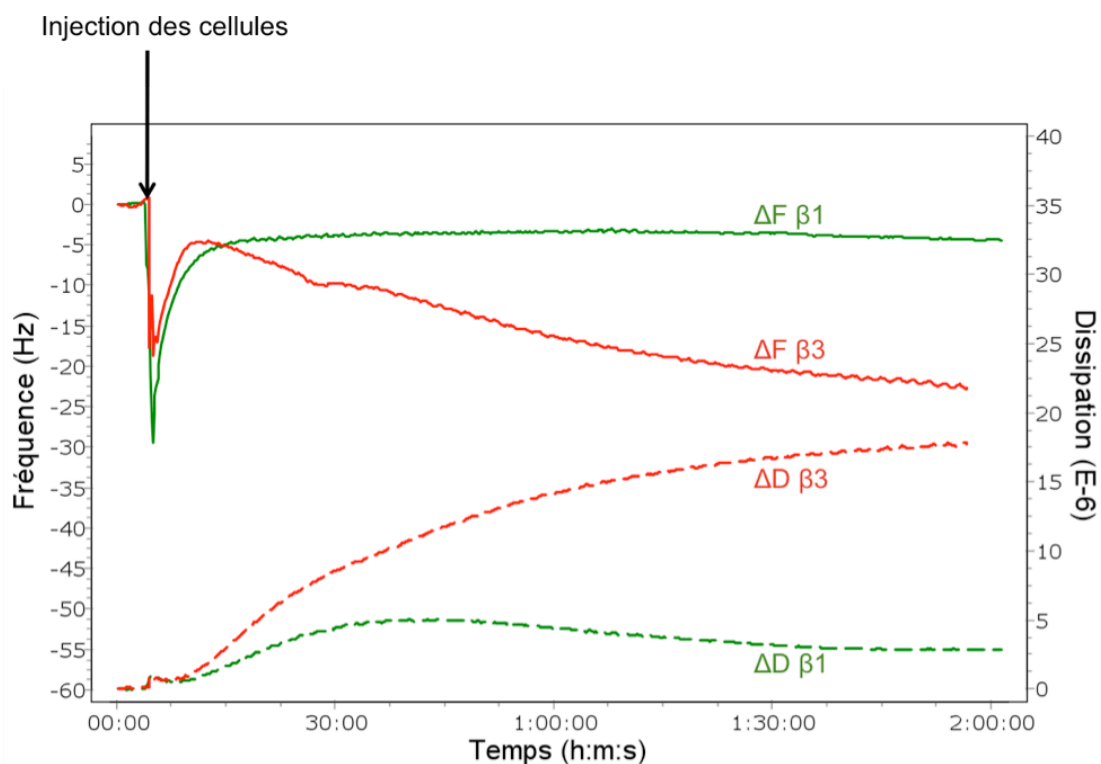


Figure 51 : Variations de fréquence (traits pleins) et de dissipation (traits pointillés) de la 9^{ème} harmonique, en mode statique, obtenues lors de l'adhésion de cellules β_3 (en rouge) ou β_1 (en vert), sur des surfaces présentant le ligand -RGD- immobilisé, *via* la streptavidine, sur une SAM présentant 0,05% de PEG-biotine.

Après l'injection des cellules, on observe un pic qui correspond à la perturbation du liquide en contact avec la surface. Après deux heures de contact avec la surface, les variations de fréquence sont de -22,5 Hz pour les cellules $\beta 3$ et de -4 Hz pour les cellules $\beta 1$. Les variations de dissipation sont de $17,7 \cdot 10^{-6}$ pour les cellules $\beta 3$ et de $2,8 \cdot 10^{-6}$ pour les cellules $\beta 1$. Les signaux de réponse pour l'adhésion des cellules $\beta 1$ correspondent à environ 17% de la réponse des cellules $\beta 3$. L'adhésion non spécifique de cellule non reconnaissante est donc relativement faible par rapport à des cellules reconnaissantes. Malgré le mode d'utilisation de la QCM-D, différent de nos travaux précédent, cette expérience a permis de montrer la sélectivité de la surface présentant les ligands -RGD- pour des cellules reconnaissantes.

3. Conclusion

Au cours de ce paragraphe, nous avons présenté d'une part les travaux de caractérisation de la couche biomoléculaire de reconnaissance par différentes techniques physico-chimiques de surfaces et d'autre part les travaux d'étude de la reconnaissance entre les intégrines surexprimées par des cellules et les ligands -RGD- immobilisés. Travailler à 0,05% de PEG-biotine dans la SAM permet de détecter et de contrôler l'étape d'immobilisation du ligand. A ce pourcentage, la spécificité de l'interaction permet de distinguer un ligand spécifique d'un ligand non adhésif.

Nous avons ainsi démontré que l'utilisation de ce système était envisageable pour la caractérisation d'autres ligands par des tests d'adhésion cellulaire.

III. Adhésion cellulaire sur bicouche lipidique

Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre de ce manuscrit, l'insertion de ligand dans une bicouche lipidique est l'une des approches possibles pour fonctionnaliser une surface et étudier ses propriétés de reconnaissance. Nous avons donc évalué cette technique en insérant des ligands lipopeptidiques **23** présentant quatre ligands -RGD- dans une bicouche lipidique supportée. La formation de la bicouche lipidique est réalisée par fusion de vésicules unilamellaires de petites tailles (SUV) contenant différents pourcentages de la molécule d'intérêt et de 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) sur une surface hydrophile. Le Schéma 34 présente les molécules constitutives de la bicouche lipidique et une représentation schématique de la bicouche.

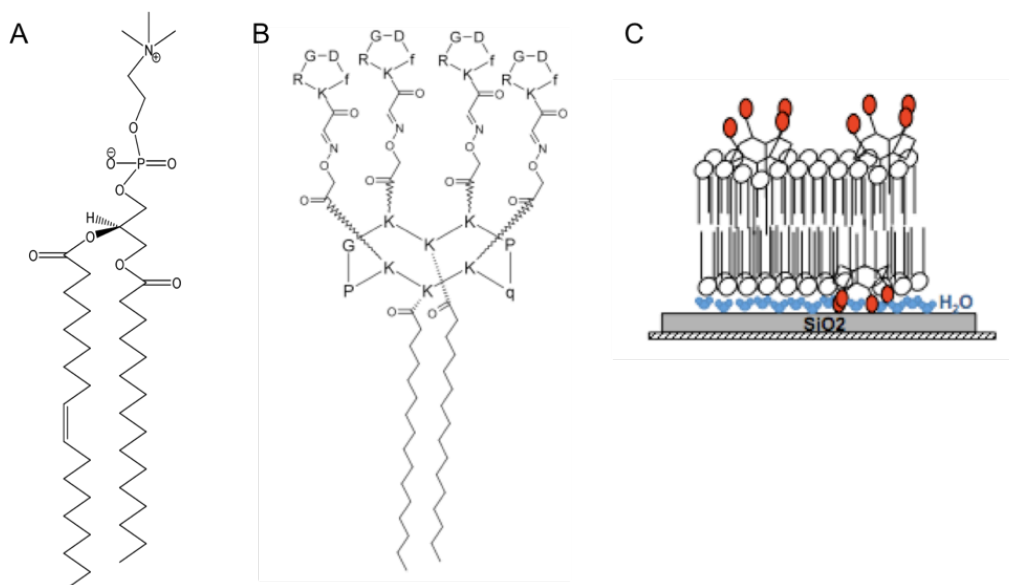


Schéma 34 : A) Formule développée du POPC ; B) Formule développée de la molécule d'intérêt 23 ; C) Schéma du système de couplage de ligand -RGD- sur une surface.

L'utilisation d'une bicouche lipidique de POPC comme support des ligands de reconnaissance permet de limiter l'adhésion non-spécifique des cellules sur les surfaces rigides (*Cf.* Chapitre I).

Les SUV sont préparées en milieu aqueux puis mises en contact avec la surface d'un cristal de quartz recouvert d'or et d'une fine couche de silice sur laquelle elles fusionnent pour former la bicouche lipidique. Les SUV ont tout d'abord été caractérisées par diffusion de la lumière et par cryoTEM (microscopie électronique à transmission réalisée sur un échantillon congelé). La formation de la bicouche et l'adhésion cellulaire sont ensuite suivies par QCM-D. Des images en microscopie optique ont été prises au cours de l'adhésion et de l'étalement cellulaire.

1. Préparation des SUV

Des SUV contenant différentes proportions des deux molécules (POPC et 23) ont été préparées afin d'évaluer l'influence de la densité de ligands incorporés dans la bicouche sur l'adhésion et l'étalement cellulaire. Les SUV sont préparées en plusieurs étapes : les deux composés lipidiques sont mis en solution dans le chloroforme, puis après évaporation du solvant, sont remis en suspension dans un tampon aqueux. Un protocole pré-établi de sonication/centrifugation permet d'obtenir la suspension de vésicules (*Cf.* Partie expérimentale). Ces SUV ont été caractérisées par diffusion de la lumière et par cryoTEM

afin de déterminer la taille, la polydispersité et de vérifier l'absence de vésicules multilamellaires (Figure 52).

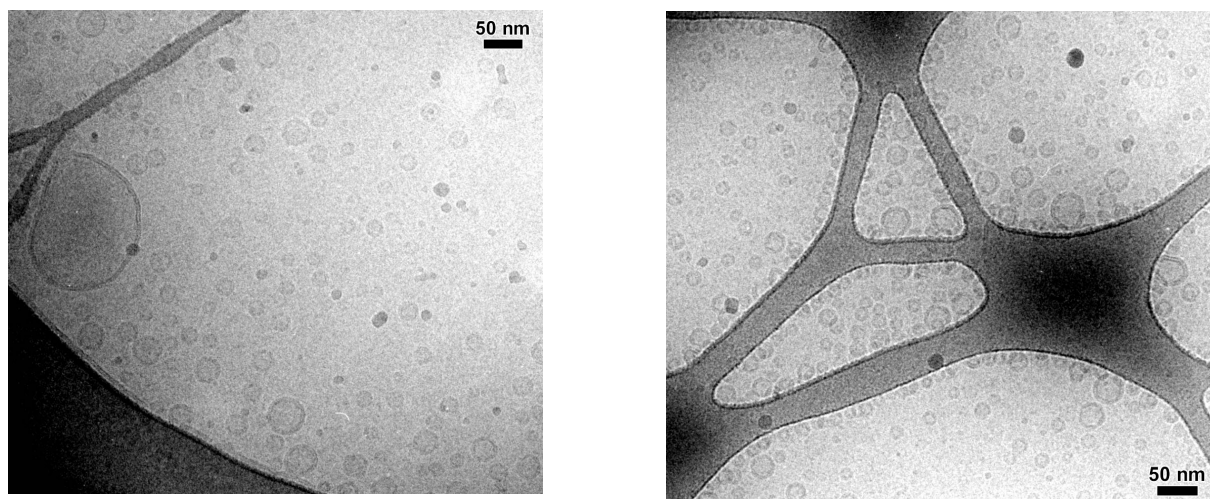


Figure 52: Images en CryoTEM de SUV composées à 100% de POPC dans le tampon TRIS à une concentration de 2 mg/ml. Ces images ont été réalisées après trois heures de centrifugation.

L'étude par CryoTEM (Figure 52) montre une grande proportion de vésicules unilamellaires d'un diamètre compris entre 20 et 50 nm, mais également en faible quantité des vésicules de grande taille (150 à 400 nm). Afin de limiter le plus possible la proportion de vésicules de grandes tailles, nous avons optimisé les conditions expérimentales en augmentant le temps de centrifugation.

L'étude de la diffusion de la lumière a été effectuée à l'aide d'un zétasizer ce qui nous a permis de déterminer, par la méthode des cumulants, un diamètre hydrodynamique moyen des SUV de 35 nm avec un indice de polydispersité de 0,16 environ. Cet indice de polydispersité inférieur à 0,25 tend à confirmer que les solutions sont majoritairement monodisperses.

2. Formation de la bicouche

La fusion des vésicules pour former une bicouche lipidique est réalisée sur un cristal de quartz recouvert d'or et d'une fine couche de silice rendant la surface hydrophile. Le phénomène est suivi par QCM-D. La formation de bicouche lipidique supportée sur silice a été largement étudiée par les équipes de A. Brisson^{146,147} et de B. Kasemo^{148,149}.

¹⁴⁶ Richter, R.P. ; Brisson, A. ; *Langmuir* **2004**, *20*, 4609-4613.

¹⁴⁷ Richter, R.P. ; Maury, N. ; Brisson, A. *Langmuir* **2005**, *21*, 299-304.

¹⁴⁸ Keller, C.A. ; Kasemo, B *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1397-1402.

¹⁴⁹ Keller, C.A. ; Glasmästar, K. ; Zhdanov, V.P. ; Kasemo, B. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 5443-5446.

Après stabilisation des signaux de fréquence et de dissipation dans le tampon, on injecte dans la chambre de mesure la suspension de SUV à 0,2 mg/ml dans le tampon Tris. La bicouche se forme alors en deux étapes, décrites dans la littérature¹⁴⁸ (Figure 53) :

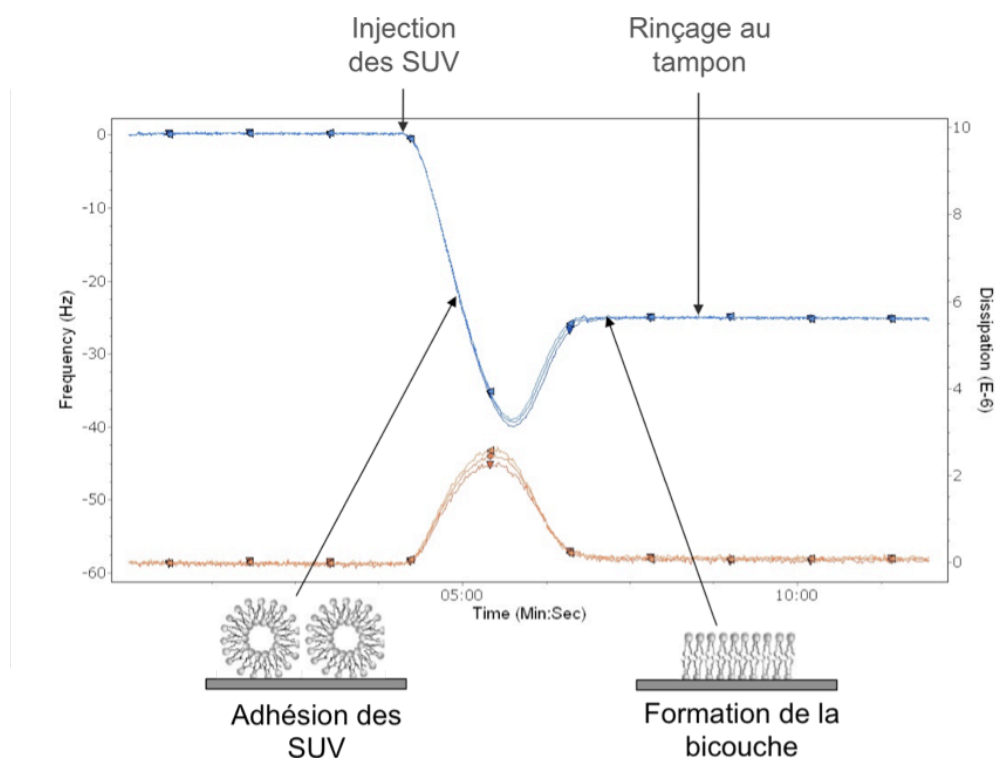


Figure 53 : Suivi par QCM-D de la formation d'une bicouche lipidique sur une surface de silice à partir de SUV de POPC. En bleu, les variations de fréquence en fonction du temps et en orange, celles de la dissipation, sur les 7^{ème}, 9^{ème} et 11^{ème} harmoniques.

Tout d'abord, les vésicules intactes adhèrent sur la surface jusqu'à une concentration critique. Cette étape se traduit par une forte diminution de la fréquence et une augmentation de la dissipation. Lorsque la concentration de vésicules sur la surface est suffisante¹⁴⁹, elles fusionnent entre elles et s'étalent sur la surface pour former la bicouche. Cette étape s'accompagne d'une libération de l'eau contenue à l'intérieur des vésicules. Il y a alors une augmentation de la fréquence et une diminution de la dissipation avant stabilisation. La variation de fréquence constatée est alors de $25,1 \pm 1,4$ Hz en moyenne et la variation de dissipation d'environ $0,2 \cdot 10^{-6}$. La Figure 53 présente les signaux issus des 7^{ème}, 9^{ème} et 11^{ème} harmoniques. On observe un léger décalage des valeurs maximales de fréquence des trois harmoniques au niveau du maximum du pic ce qui est concordant avec l'augmentation de dissipation. Ceci indique la présence d'un film dissipatif et confirme donc l'adsorption des SUV sur la surface. A la fin du processus, les valeurs de fréquence et de dissipation pour les trois harmoniques sont identiques avec une très faible valeur de dissipation. Ceci confirme la

formation de la bicouche, solidaire des oscillations du quartz et nous permet d'appliquer la relation de Sauerbrey pour déduire la masse surfacique de la bicouche à partir de la variation de fréquence. L'équation de Sauerbrey conduit à une masse surfacique de $444,3 \pm 24,8 \text{ ng/cm}^2$. Cette valeur est comparable à celles rapportées dans la littérature^{148,150} et prend en compte l'eau d'hydratation de la couche (30 % de la bicouche en volume) ainsi que la couche d'eau entre la surface de SiO_2 et la bicouche (épaisseur environ 3 nm)¹⁵¹. La bicouche ainsi formée est stable même lors du rinçage de la chambre de mesure.

Les deux figures suivantes (Figure 54 et Figure 55) présentent chacune la superposition d'expériences réalisées avec un même pourcentage de molécule **23** (respectivement 0% et 1%).

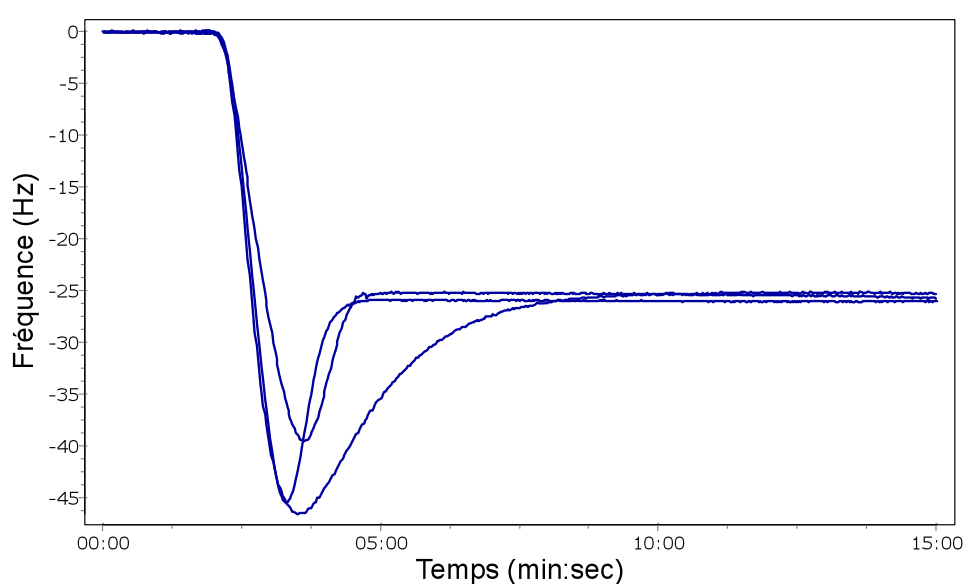


Figure 54 : Suivi par QCM-D de la formation de la bicouche à partir de SUV de POPC ; expériences réalisées des jours différents à partir de la même solution de SUV conservée au frigo.

¹⁵⁰ Richter, R. ; Mukhopadhyay, A. ; Brisson, A. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3035-3047.

¹⁵¹ Johnson, S.J. ; Bayerl, T.M. ; McDermott, D.C. ; Adam, G.W. ; Rennie, A.R. ; Thomas, R.K. ; Sackmann, E. *Biophys. J.* **1991**, *59*, 289-294.

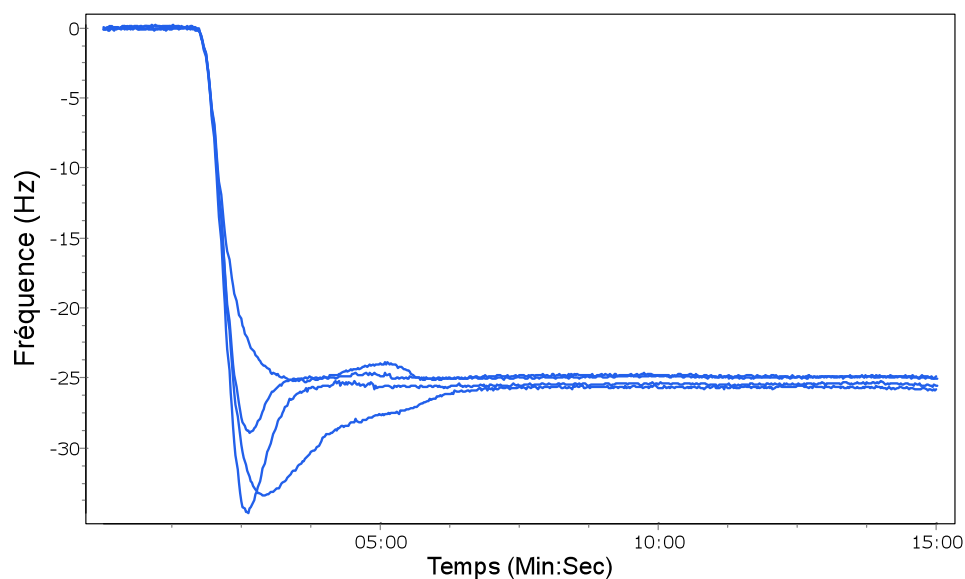


Figure 55 : Suivi par QCM-D de la formation de la bicouche à partir de SUV contenant 1% de la molécule 23 ; expériences réalisées le même jour, en parallèle, à partir de la même solution de SUV.

La Figure 54 montre la variation de fréquence observée lors de la formation d'une bicouche de molécule de POPC et la Figure 55 montre la variation de fréquence observée pour la formation d'une bicouche contenant 1% de molécule 23. Les profils généraux de toutes ces expériences sont les mêmes (diminution puis augmentation et stabilisation du signal autour de -25 Hz) ce qui permet de montrer que l'incorporation du lipopeptide dans les SUV ne modifie en rien le processus de formation de la bicouche. Comme le montre les Figure 54 et Figure 55, la forme du pic correspondant à la transition vésicules/bicouche est variable d'une expérience à l'autre. Sur la Figure 55, une des courbes ne présente pas de pic de transition : ce phénomène peut être expliqué par la concentration en SUV sur la surface qui serait immédiatement suffisante pour qu'elles fusionnent entre elles et forment la bicouche. Quelque soit le profil du pic, les variations finales de fréquence et de dissipation sont globalement constantes. Par ailleurs, il n'y a pas de relation entre la forme du pic et les différents pourcentages étudiés de molécule 23. B. Kasemo a montré que la vitesse de formation de la bicouche était dépendante de la concentration de SUV en solution mais que l'amplitude du pic ne dépendait pas de cette concentration.^{148,152} Il a également montré que la taille des vésicules influe sur les variations maximales de fréquence et de dissipation ainsi que sur le temps nécessaire pour atteindre cette valeur maximale mais que le profil de cinétique ne variait pas. Dans notre cas, les différences observées peuvent donc être principalement dues à l'état de chaque surface de silice et à des variations de la taille des SUV au cours du temps, les mêmes suspensions étant utilisées pendant un mois.

¹⁵² Reimhult, E. ; Höök, F. ; Kasemo, B. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 7401-7404.

3. Tests d'adhésion cellulaire

a. Suivi par QCM-D

L'étude a porté sur l'influence de la variation du pourcentage du composé **23** dans la bicouche sur l'adhésion et l'étalement cellulaire. La Figure 56 présente le suivi par QCM-D des trente-cinq premières minutes de l'adhésion cellulaire sur des surfaces présentant différents pourcentages de ligand -RGD-. Une expérience de contrôle est également présentée, effectuée sur la surface à 1% de molécule **23** dans la bicouche avec des cellules $\beta 1$ (donc ne reconnaissant pas le ligand -RGD-).

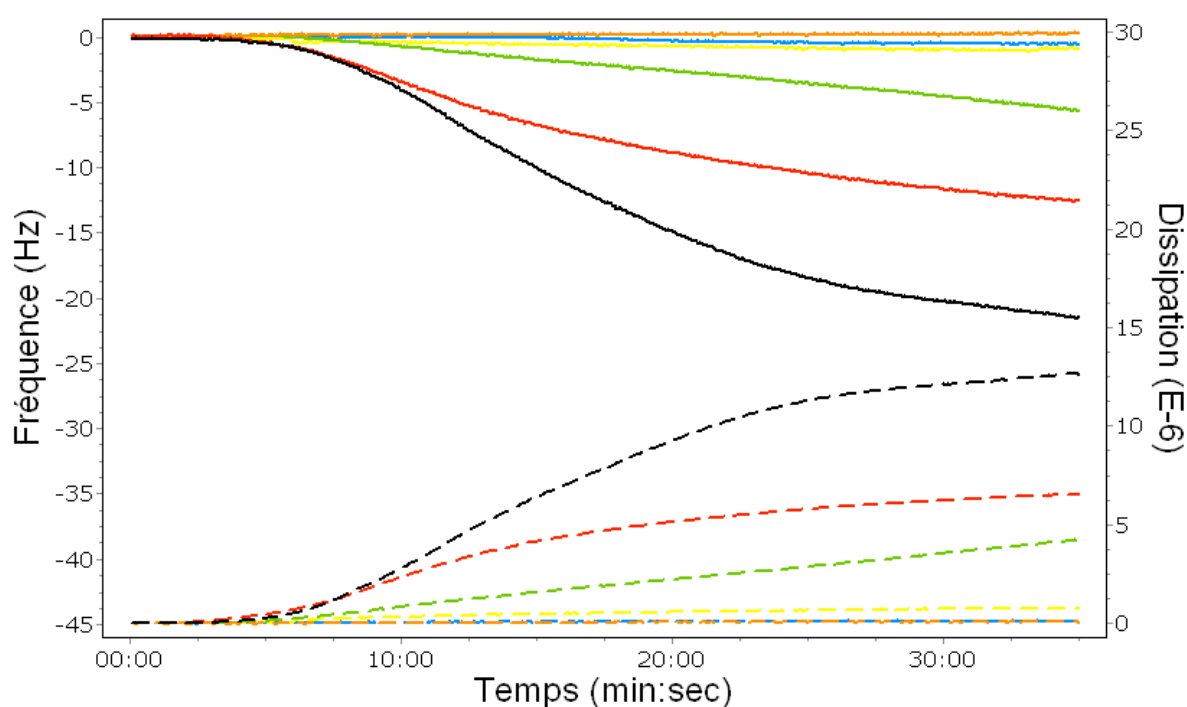


Figure 56 : Variation de fréquence (traits continus) et de dissipation (traits pointillés) pour la 9^{ème} harmonique en fonction du temps lors des trente-cinq premières minutes d'adhésion de cellules $\beta 3$ sur une bicouche lipidique de POPC (en bleu) ou contenant différents pourcentages de **23 (jaune 0,01%; vert 0,1%; rouge 1%; noir 5%) ou de cellules $\beta 1$ sur une bicouche lipidique contenant 1% de **23** (orange).**

Sur une surface de POPC (en bleu), les signaux de fréquence et de dissipation ne présentent pas de variations. De même, les cellules $\beta 1$ mises en contact avec une surface à 1% de lipopeptides **23** n'induisent pas de variations de fréquence et de dissipation. Comme nous l'avons expliqué, la QCM-D n'est pas sensible aux cellules simplement déposées par sédimentation mais ne sonde que les cellules fortement attachées à la surface. La surface de POPC et le test avec les cellules $\beta 1$ ne présentent pas de variation de fréquence et de

dissipation confirmant que le système de bicouche utilisée dans ce travail ne provoque pas d'adhésion non spécifique.

Pour 0,01%, 0,1%, 1% et 5% de molécule **23** dans la bicouche, on observe des variations de fréquence et de dissipation qui augmentent graduellement indiquant un processus d'adhésion des cellules sur les surfaces. L'adhésion cellulaire est donc due à la présence des ligands -RGD- dans la couche, le nombre de cellules adhérentes et leur étalement augmentant avec la quantité de ligands immobilisés. A 0,01% de lipopeptide dans la couche, on ne détecte pas ou peu d'adhésion cellulaire. Afin de comparer ce pourcentage limite avec les données de la littérature, il est nécessaire d'estimer l'espacement entre deux ligands. La surface moyenne (σ) occupée par un phospholipide est de $0,7 \text{ nm}^2$.^{153,154} On utilise alors le même raisonnement que pour le calcul de l'espacement des PEG-biotine dans la SAM. Si on considère d'une part que le rapport (R) des concentrations des deux espèces est identique en solution et sur la surface et d'autre part que chaque molécule **23** est au centre d'un carré de côté L, on a alors :

$$L = (\sigma/R)^{1/2} \quad \text{et} \quad D = 1/A = 1/(\sigma/R) = R/\sigma$$

avec L = côté du carré ; σ = surface occupée par une molécule ; R = rapport de concentration entre les deux espèces ; D = densité de ligand ; A = Aire du carré.

Pour R = 0,01%, on a donc un espacement (L) entre deux ligands d'environ 84 nm et une densité (D) d'environ 140 molécules **23** par μm^2 . Ces résultats sont en accord avec J. Spatz qui a montré récemment qu'avec des ligands -RGD- espacés de plus de 70 nm, l'adhésion cellulaire était fortement diminuée.¹⁵⁵ Il explique qu'au delà de cet espacement, les intégrines ne peuvent plus former de complexes qui activeraient la formation des fibres d'actine nécessaires à l'adhésion focale.

Le calcul précédent est basé sur l'hypothèse que les ligands insérés dans la bicouche sont répartis de façon aléatoire sur la surface. Nous avons cependant estimé nécessaire de vérifier cette hypothèse. En effet, les molécules de POPC et les molécules **23** présentent des structures très différentes, que ce soit au niveau de la partie lipidique (présence d'une double

¹⁵³ Purrucker, O. ; Gönnerwein, S. ; Förtig, A. ; Jordan, R. ; Rusp, M. ; Bärmann, M. ; Moroder, L. ; Sackmann, E. ; Tanaka, M. *Soft Matter* **2007**, *3*, 333-336.

¹⁵⁴ Nagle, J.F. ; Tristram-Nagle, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1469*, 159-195.

¹⁵⁵ Huang, J ; Gräter, S.V. ; Corbellini, F. ; Rinck, S. ; Bock, E. ; Kemkemer, R. ; Kessler, H. ; Ding, J. ; Spatz, J.P. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1111-1116.

liaison sur une des deux chaînes hydrocarbonées de la POPC) ou au niveau de la tête polaire (Schéma 34). La formation d'agrégats pourrait donc être envisagée dans la bicouche entre molécules identiques. Dans la molécule **23**, la hauteur du cyclodécapeptide porteur des quatre ligands -RGD- a été estimée par modélisation moléculaire à 4,5 nm, tandis que la longueur de la tête polaire du POPC est de l'ordre de 1 nm. Si des agrégats de cyclodécapeptide se forment à la surface de la bicouche lipidique, on peut donc raisonnablement penser qu'ils émergent de la bicouche d'environ 3,5 nm. Des études par microscopie à force atomique ont été réalisées afin d'imager en milieu liquide la topographie de surfaces atomiquement planes de SiO₂ (wafer de silicium) fonctionnalisées par une bicouche lipidique. La comparaison des images obtenues (Figure 57) pour des bicouches de POPC d'une part et pour des bicouches mixtes de molécules **23** à 5% par rapport à la POPC, devrait permettre de mettre en évidence la présence éventuelle d'agrégats.

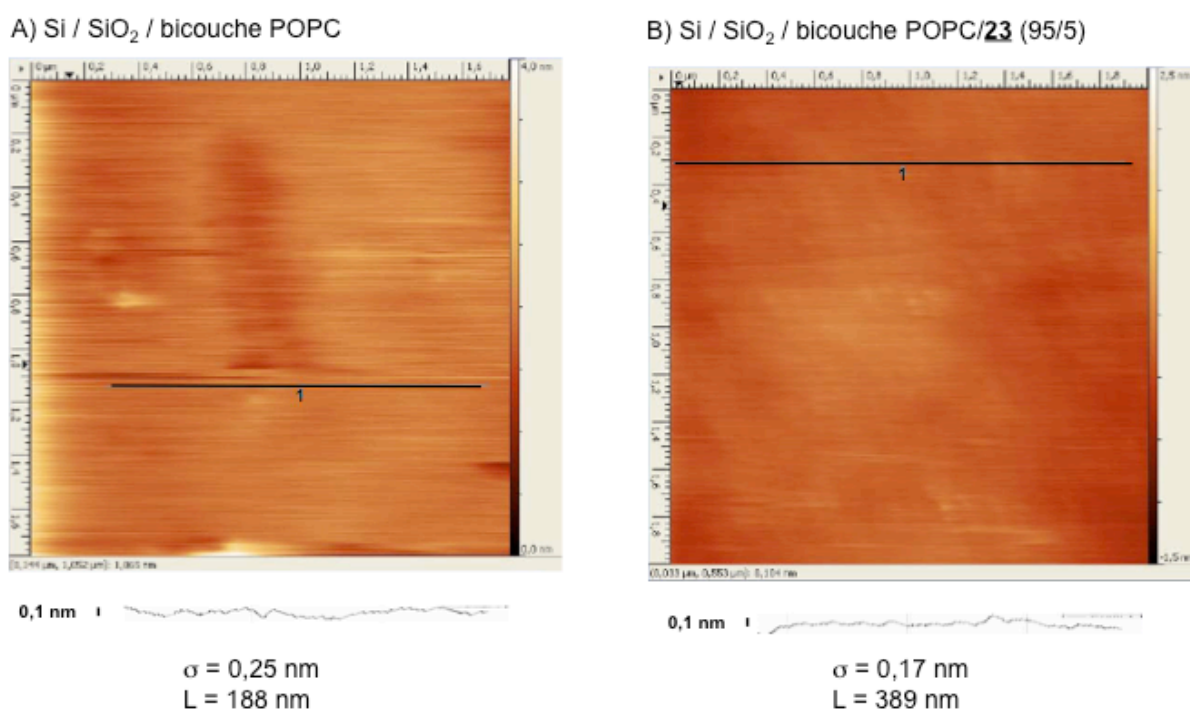


Figure 57 : Topographie en milieu liquide (2µm × 2µm) de bicouches lipidiques supportées sur wafer de silicium obtenues par fusion de A) SUVs de POPC pur et B) SUVs mixtes de POPC/23** (95/5). Les profils de rugosité correspondant aux lignes noires sont représentés sous chaque image. Les « root mean square » (σ) et longueur de corrélation (L) sont également indiqués pour chaque image.**

On observe, sur chacune de ces images, une rugosité de surface de l'ordre de 0,2 nm tout à fait compatible avec la formation d'une bicouche lipidique supportée. L'existence

d'agrégats émergeant de la surface n'a pas pu être mise en évidence, ce qui est en accord avec notre hypothèse d'une répartition aléatoire des ligands sur la surface.

Il convient de préciser que ces mesures AFM ont été validées en imageant des surfaces sur lesquelles les vésicules s'adsorbent mais ne fusionnent pas pour former une bicouche lipidique.¹⁵⁶ Ces expériences ont été réalisées sur des surfaces obtenues par dépôt d'or sur un wafer de silicium et modifiées par une monocouche autoassemblée d'alcanethiols présentant des groupements éthylène glycol. La Figure 58 montre la topographie de ces surfaces avant et après adsorption de vésicules de POPC.

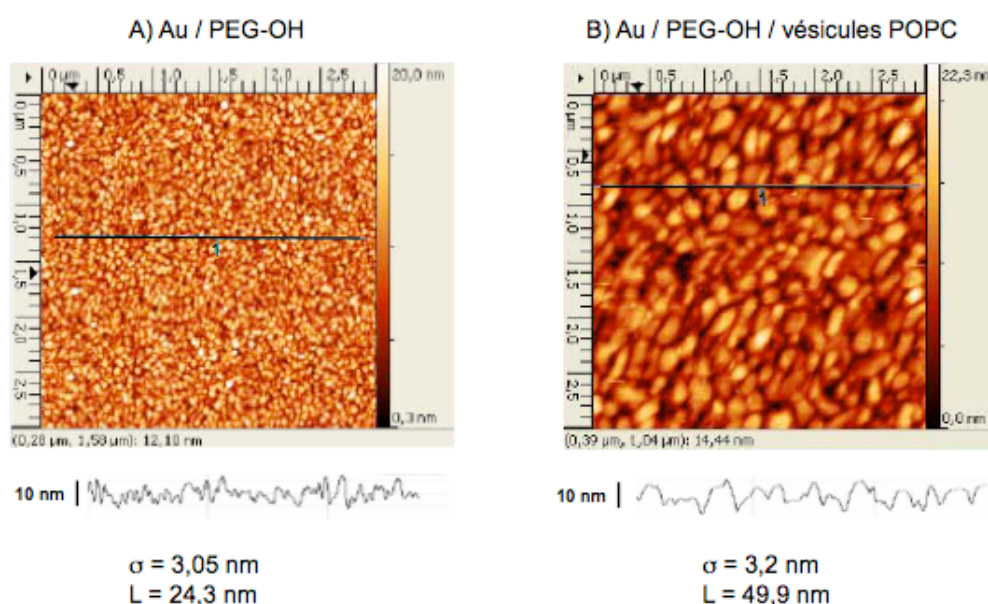


Figure 58 : Topographie (3μm × 3μm) en milieu liquide A) d'une surface d'or modifiée par une monocouche d'alcanethiols possédant une extrémité oligoéthylène glycol, et B) de la même surface après interaction avec une suspension aqueuse de vésicules de POPC. Les profils de rugosité correspondant aux lignes noires sont représentés sous chaque image. Les « root mean square » (σ) et longueurs de corrélation (L) sont également indiqués pour chaque image.

Il apparaît très clairement sur cette expérience, que les vésicules de POPC s'adsorbent sur ces surfaces mais ne fusionnent pas. De manière classique, la surface d'or se présente sous forme d'une surface « granuleuse » avec une rugosité de l'ordre de 3 nm et des grains de taille 25 nm (longueur de corrélation). L'image B (Figure 58), obtenue après interaction avec des vésicules de POPC, présente une longueur de corrélation de 50 nm en accord avec la présence de vésicules de POPC adsorbées sur la surface. La rugosité de la surface reste faible (3,2 nm) ce qui semble indiquer que les vésicules de POPC sont légèrement aplaties sur la surface, en

¹⁵⁶ H. Basit, *Thèse de l'Université Joseph Fourier, en cours.*

bon accord par ailleurs avec le fait que la longueur de corrélation (50 nm) est légèrement supérieure au diamètre moyen des vésicules en suspension (35 nm, Figure 52).

Tous les résultats de QCM-D présentés ici ne montrent que les trente cinq premières minutes après que les cellules ont été injectées sur la surface. La suite des expériences n'est pas présentée car nous avons systématiquement observé une forte dérive de la fréquence et de la dissipation au bout d'environ 45 minutes de contact des cellules avec la surface (Figure 59).

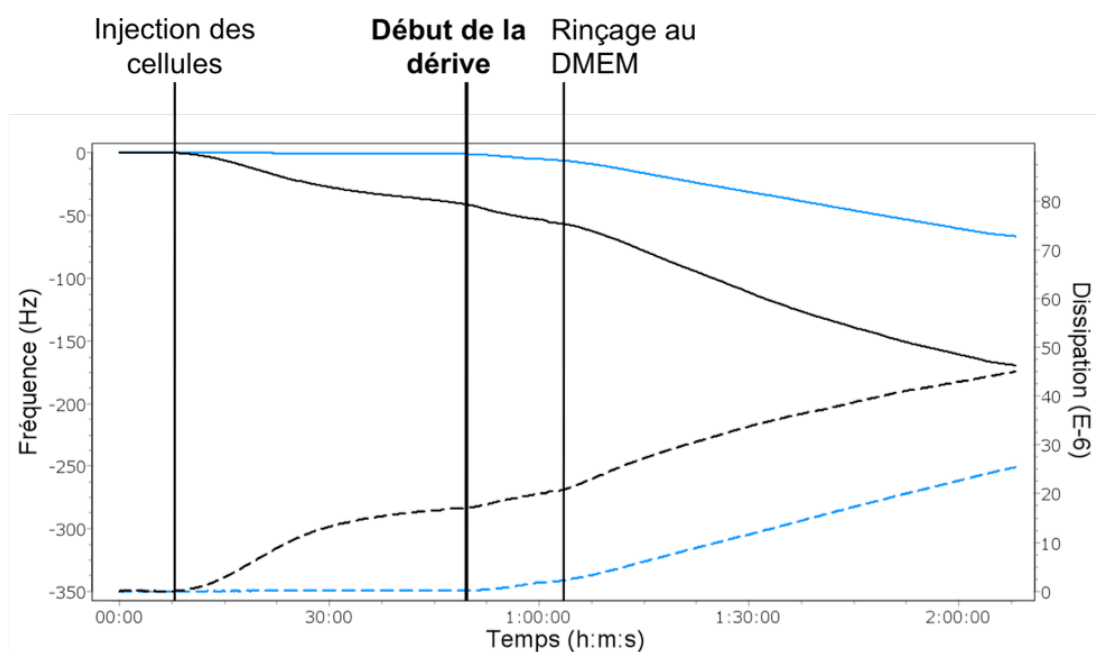


Figure 59 : Variation de fréquence (traits pleins) et de dissipation (traits pointillés) pour la 9^{ème} harmonique lors de l'adhésion cellulaire sur une bicouche POPC (bleu) et sur une bicouche contenant 5% du lipopeptide 23 (noir).

Après environ 45 minutes, les signaux de fréquence et de dissipation, alors qu'ils semblaient se stabiliser, respectivement diminuent et augmentent fortement. Ces fortes variations n'ont pas lieu si on n'injecte que du DMEM sans cellules ce qui montre que ce n'est pas un problème de force ionique du milieu. Par contre, comme on peut le voir sur la Figure 59, cette situation a lieu même sur une surface ne contenant pas de ligands (tracé bleu). Ces signaux vont dans le sens d'une masse plus importante adsorbée sur la surface. Dans la littérature, des cellules adhérentes sur une bicouche ont été observées par microscopie optique sur 24 heures et présente un étalement avec la formation de points d'adhésion focale non attendue.^{157,39} J. Groves explique que les cellules peuvent partiellement pénétrer la membrane et ainsi adhérer fortement à la surface.¹⁵⁷ La fluidité de la membrane la rend inapte à résister

¹⁵⁷ Groves, J.T. ; Mahal, L.K. ; Bertozzi, C.R. *Langmuir* **2001**, *17*, 5129-5133.

aux forces d'adhésion exercées par les cellules. Afin d'éviter ce problème et d'optimiser ainsi l'étude de l'adhésion cellulaire, il serait intéressant de modifier la composition de la bicouche en utilisant des phospholipides avec un plus grand nombre de chaînes insaturées ou en introduisant du cholestérol.

Afin d'étudier le comportement des cellules sur les surfaces présentant différentes densités en ligands -RGD-, nous avons réalisé des images par microscopie optique au cours de l'adhésion cellulaire.

b. Suivi par microscopie optique

Afin de visualiser le processus d'adhésion cellulaire, des films ont été réalisés sur des bicouches présentant le ligand RGD à 0,1% et à 1%. Les cellules sont injectées pendant environ quinze minutes sur la surface puis l'étalement cellulaire est enregistré pendant une heure.

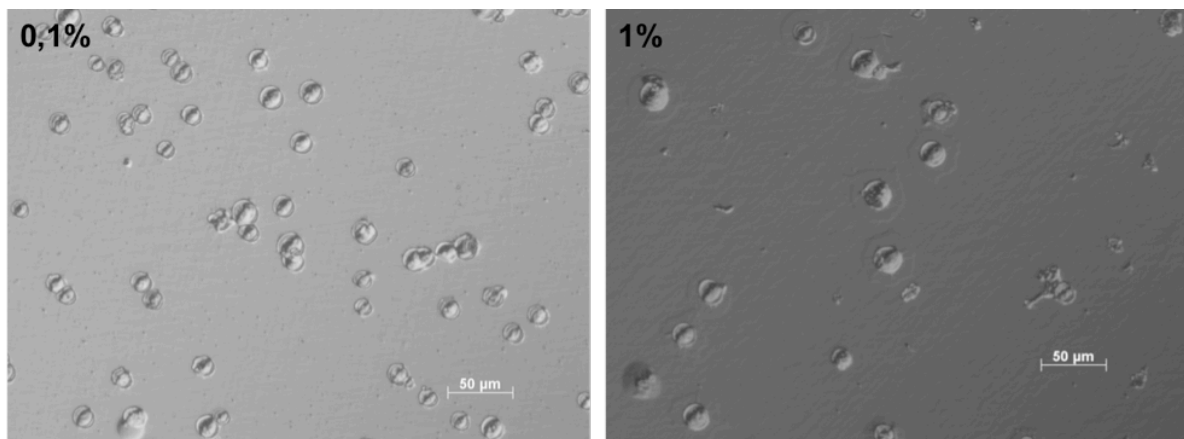


Figure 60 : Comparaison des images prises par microscopie optique (grossissement x200) lors de l'adhésion cellulaire sur des bicouches lipidiques présentant 0,1% (à gauche) ou 1% (à droite) de ligand -RGD- 23. Ces deux images ont été prises environ 1h15 après l'injection des cellules sur la surface.

L'analyse des images de la Figure 60 montre qu'il y a plus de cellules sur la surface à 0,1% qu'à 1% de ligands immobilisés alors qu'on s'attend au phénomène inverse. En effet, la QCM-D a préalablement montré des variations de fréquence et de dissipation plus importantes à 1% qu'à 0,1% de ligands, mais il est important de noter que cette technique n'est sensible qu'aux cellules liées à la surface *via* des interactions ligand/récepteur. L'hypothèse la plus probable est un problème de sédimentation des cellules avant l'injection dans la chambre de mesure. Malgré l'agitation, la suspension cellulaire n'est pas homogène puisqu'elle contient des agrégats qui ne se redispersent pas. Il en résulte un plus faible nombre

de cellules injectées dans la chambre de mesure à 1% qu'à 0,1% de ligands. Il est donc impossible de se fier au nombre de cellules se déposant sur la surface. La microscopie ne permet pas de quantifier le nombre de cellules adhérentes dans notre cas. Elle n'est donc utilisée dans ce travail que pour visualiser l'étalement des cellules. Les Figure 61 et Figure 62 présentent des agrandissements des images précédentes à différents temps de l'adhésion cellulaire.

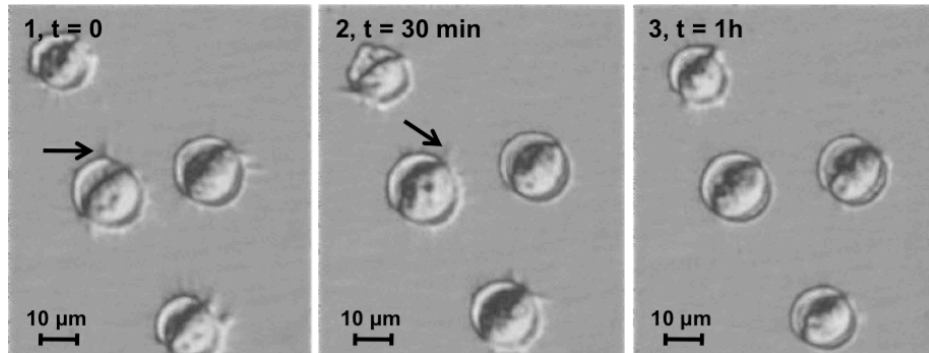


Figure 61 : Images de suivi de l'adhésion cellulaire prises au microscope sur une surface présentant 0,1% du ligand -RGD- 23 dans une bicouche lipidique. Les temps sont relatifs au début d'enregistrement du film. La barre d'échelle représente 10 µm.

Sur les surfaces présentant 0,1% de lipopeptides (Figure 61), les cellules gardent une morphologie ronde avec un diamètre de 15 à 20 µm et sans extension de la membrane. On observe cependant (image 2) des podés qui sondent la surface (indiqués par des flèches). A cette concentration de ligand, les cellules adhèrent mais ne s'étalent pas.

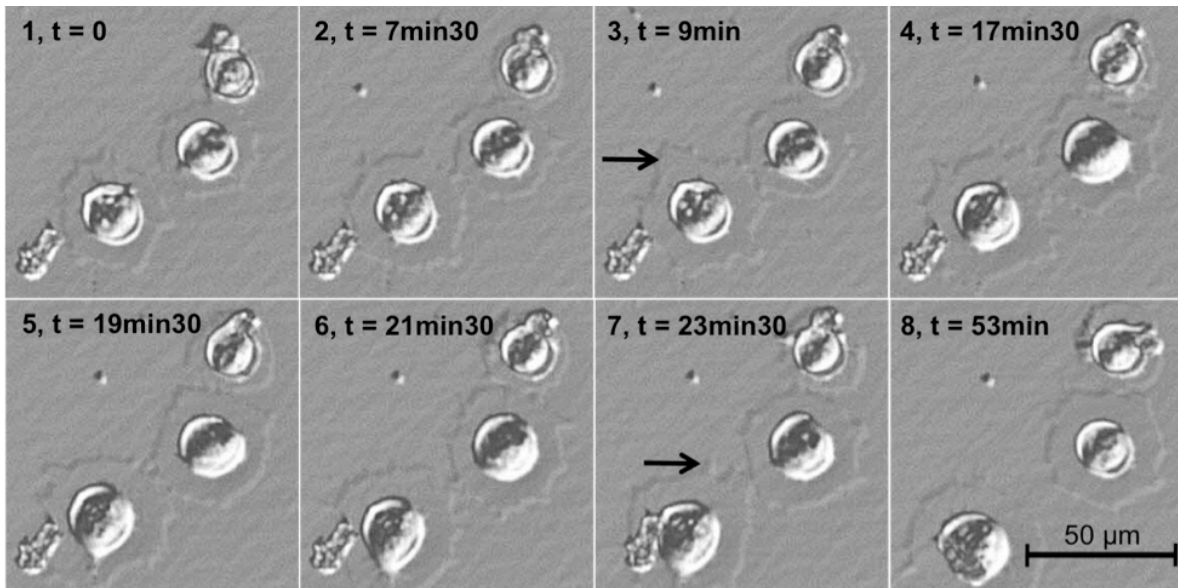


Figure 62 : Images de suivi de l'adhésion cellulaire prises au microscope sur une surface présentant 1% du ligand -RGD- 23 dans une bicouche lipidique. Les temps sont relatifs au temps de début d'enregistrement du film.

Sur les surfaces présentant 1% de ligand 23 (Figure 62), les cellules HEK- β 3 présentent une morphologie étalée avec un diamètre d'environ 40 μm . La cellule forme des podes (indiqués par des flèches sur les images 3 et 7) qui permettent à la cellule de sonder la surface et de se déplacer (image 5 à 8). En utilisant la même méthode qu'au paragraphe précédent, on calcule avec ce pourcentage une densité de ligand de 14300 molécules par μm^2 avec un espacement de 10 nm.

Plusieurs résultats relatifs à l'incorporation de peptides amphiphiles dans des bicouches lipidiques publiés dans la littérature montrent également une augmentation de l'adhésion et de l'étalement des cellules avec la densité de ligands -RGD-.^{34,39} Cependant, la quantité minimale de ligands nécessaire à l'adhésion et à l'étalement varie d'une étude à l'autre. M. Tirrell a déterminé un minimum de 33000 molécules/ μm^2 pour observer l'adhésion et l'étalement de cellules.¹⁵⁸ P. Messersmith a montré que l'adhésion des cellules augmente fortement entre 0,02% (1023 molécules/ μm^2) et 0,5% (25300 molécules/ μm^2), pourcentage pour lequel l'adhésion est maximale.⁴⁰ La différence des résultats obtenus peut être expliquée par les différences de lignées cellulaires utilisées (fibroblastes, HUVEC, HEK...), l'orientation des ligands étudiés (linéaire, flexible, cyclique) et la composition en phospholipides de la bicouche. Ces différents paramètres engendrent une variabilité qui rend difficile une comparaison rigoureuse de nos travaux avec les autres études.

¹⁵⁸ Bresalski, M.A. ; Knaebel, A. ; Tu, R. ; Tirrell, M. *Biomaterials* **2006**, 27, 1259-1269.

4. Conclusion

La microbalance à cristal de quartz et la microscopie optique sont des techniques complémentaires qui ont permis d'évaluer l'adhésion spécifique et l'étalement cellulaire sur des bicouches lipidiques fonctionnalisées. L'espace minimal nécessaire a été évalué à 27 nm (0,1%) pour l'adhésion et à 10 nm (1%) pour l'étalement cellulaire. Ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des cellules ayant une morphologie aplatie impliquant la formation de différentes extensions de la membrane cellulaire sur des bicouches lipidiques supportées. Afin de résoudre les problèmes de manque de stabilité de la membrane par les cellules et d'optimiser les processus cellulaires, il serait intéressant de faire varier la composition phospholipidique et donc la fluidité de la bicouche. Ce système pourrait ensuite être utilisé comme membrane biomimétique dans l'étude de nouveaux ligands.

IV. Couplage covalent

La troisième méthode de greffage envisagée est l'immobilisation du ligand par couplage covalent sur une SAM. La fonctionnalisation de la surface d'or est réalisée en deux temps : une monocouche d'alcane-thiols présentant les groupements précurseurs du couplage est adsorbée sur or puis la molécule d'intérêt est mise en contact avec la SAM pour réaliser la ligation chimiosélective. Les différentes réactions de couplage covalent utilisées sur des surfaces ont été présentées dans le premier chapitre. L'intérêt de cette méthode d'immobilisation par rapport au couplage affiné et à la formation d'une bicouche lipidique est qu'elle permet un contrôle de la densité de greffage par électrochimie en faisant réagir une sonde redox sur la surface.^{52,159,160}

Lors de notre travail, nous avons étudié deux réactions de couplage covalent qui seront présentées successivement : le couplage par formation d'un lien oxime et le couplage par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens.

1. Couplage par formation d'un lien oxime

a. Introduction

Le premier couplage covalent envisagé est la formation d'un lien oxime, entre une fonction oxyamine et un groupement carboxyle. Cette réaction a été largement décrite et utilisée dans le chapitre II de ce manuscrit pour la synthèse des macromolécules peptidiques.

¹⁵⁹ Chan, E.W.L. ; Yu, L. *Langmuir* **2002**, *18*, 311-313.

¹⁶⁰ Collman, J.P. ; Devaraj, N.K. ; Eberspacher, T.P.A. ; Chidsey, C.E.D. *Langmuir* **2006**, *22*, 2457-2664.

Cette réaction a également été décrite dans la littérature pour le couplage de biomolécules sur des surfaces.⁴⁷ M. Yousaf a utilisé ce lien chimiosélectif pour immobiliser des ligands -RGD- sur des surfaces. La fonction aldéhyde, générée directement sur la surface par oxydation d'une fonction alcool par le chloro-chromate de pyridinium (PCC), réagit avec le ligand qui présente une fonction oxyamine.^{52,53} La quantité d'aldéhyde formé est fonction du temps de réaction avec le PCC. Cet auteur a également mis au point une méthode d'immobilisation de ligands -RGD- sur des SAMs qui permet de suivre par électrochimie la réaction de couplage et de déterminer la densité de greffage des ligands : la formation du lien oxime se fait entre des groupements quinone sur la surface et des ligands -RGD- porteurs d'une fonction oxyamine. En effet, le signal électrochimique de la quinone est modifié après formation du lien oxime ce qui permet de suivre et de quantifier le greffage du ligand.⁵⁴

Pour notre travail, la fonction oxyamine est présentée sur la surface par formation d'une SAM mixte équimolaire de thiol-PEG-OH commercial et de thiol-PEG-ONH₂ **30** préalablement synthétisé (Schéma 35).

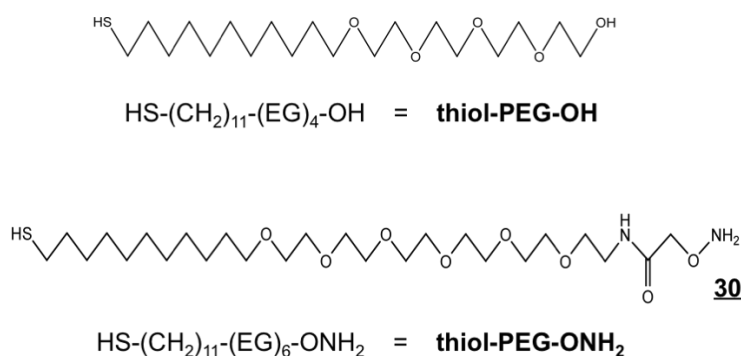


Schéma 35 : Formules des alcanethiols utilisés au cours de ce travail.

La surface ainsi formée peut réagir avec la molécule d'intérêt **27** préalablement synthétisée et présentant une fonction aldéhyde et quatre ligands -RGD- (Schéma 36).

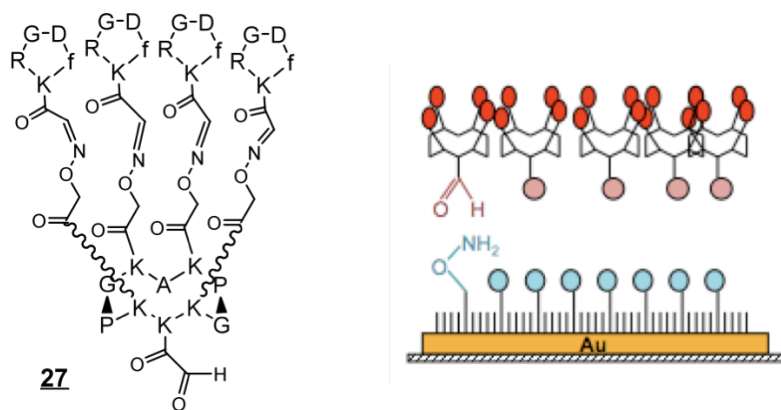


Schéma 36 : Formule développée de la molécule d'intérêt 27 présentant quatre ligands -RGD- et schéma de la construction de la couche de reconnaissance.

Cependant, avant de fonctionnaliser la SAM avec la molécule 27, nous avons évalué la capacité de la SAM fonctionnalisée par des groupements oxyamine à former des liens oxime avec une molécule présentant une fonction aldéhyde. Pour cela, nous avons utilisé une molécule ayant des propriétés redox, le ferrocène-aldéhyde et évalué son couplage par voltamétrie cyclique. Par intégration de l'intensité du courant de pic d'oxydation, cette sonde redox permet de quantifier le nombre de molécules d'oxyamine ayant réagi.

b. Mise au point du protocole de formation de la couche de biomolécules

Plusieurs tests ont été effectués mais aucun n'a été concluant. Cela nous a cependant permis d'optimiser les conditions de formation de la SAM et du lien oxime pour minimiser les réactions parasites qui pourraient avoir lieu, dues à la forte réactivité des oxyamines. Nous avons notamment diminué le temps d'adsorption des alcanethiols lors de la formation de la SAM et effectué le greffage de la surface et la fonctionnalisation sous flux d'argon. En effet, l'air ambiant contient des carboxyles comme le formaldéhyde qui peuvent réagir avec les oxyamines.

Un premier test a été réalisé dans les conditions suivantes. La SAM est formée pendant ½ h à partir d'une solution équimolaire de thiol-PEG-OH et de thiol-PEG-ONH₂ à 1 mM dans l'éthanol. Elle est ensuite fonctionnalisée pendant ¼ h avec le ferrocène-aldéhyde à 1 mM dans un mélange acétonitrile/tampon acétate (pH = 4). L'acétonitrile permet de solubiliser le ferrocène-aldéhyde et le milieu acide permet de favoriser la formation du lien oxime (Figure 13).

La Figure 63 présente la courbe de voltamétrie cyclique obtenue dans un électrolyte aqueux à 0,1 M en KPF₆ pour la surface ainsi formée.

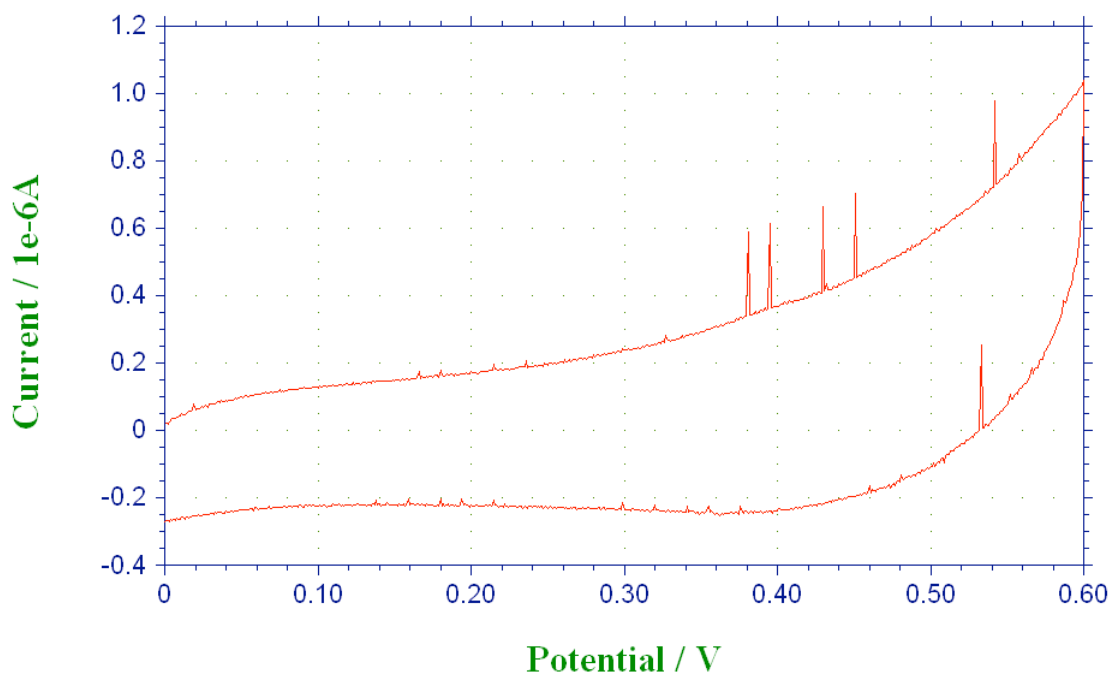


Figure 63 : Courbe de voltamétrie cyclique obtenue dans une solution aqueuse de KPF_6 à 0,1 M pour une surface présentant des groupements ferrocène immobilisés sur la SAM *via* des liens oxime ($V = 20 \text{ mV/s}$).

La courbe de la Figure 63 ne montre aucun signal caractéristique du ferrocène. Soit le ferrocène n'est pas greffé sur la surface, soit le nombre de ferrocène immobilisé est tellement faible qu'il n'est pas détectable par électrochimie. Afin de vérifier que la SAM s'est bien formée à la première étape, nous avons réalisé la désorption réductrice de la couche (Figure 64).

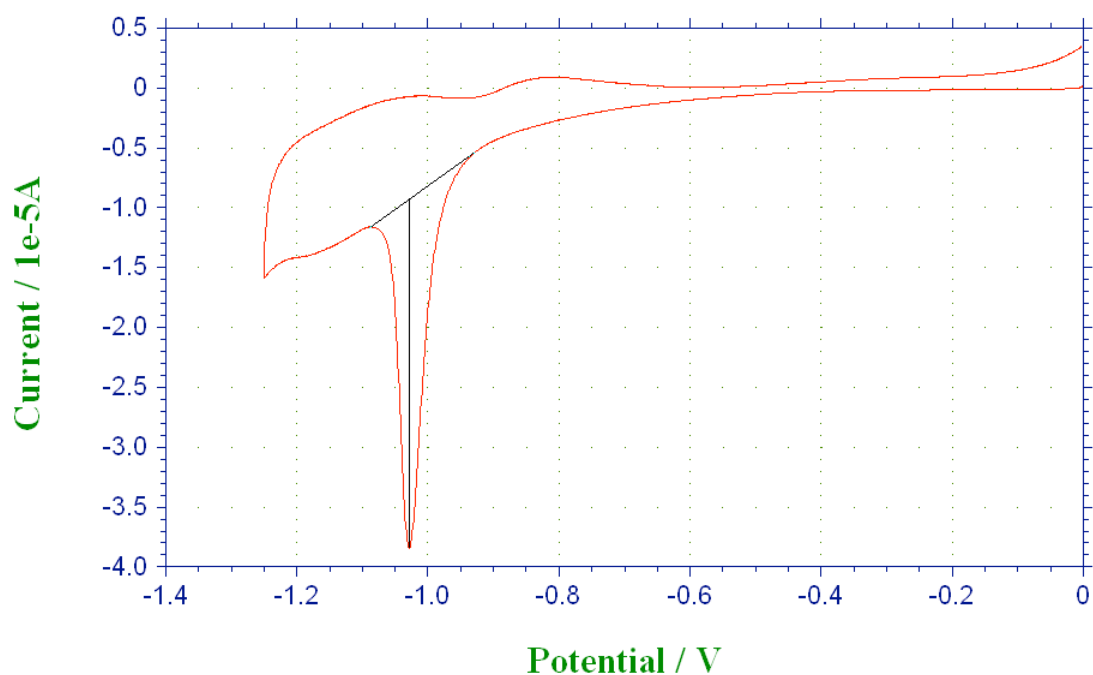


Figure 64 : Signal électrochimique obtenu lors de la désorption réductrice dans NaOH 0,5 M de la couche préalablement formée ($V = 20 \text{ mV/s}$).

La Figure 64 montre un pic de désorption des molécules de thiol vers $-1,03$ V. L'intégration du courant de pic donne une densité de greffage d'environ $7,2 \cdot 10^{-10}$ mol/cm². Cette valeur est tout à fait comparable à celles obtenues pour les couches de PEG-biotine dans le premier paragraphe de ce chapitre, indiquant ainsi que la SAM est bien formée. Le problème se situe donc lors de la deuxième étape de la formation de la couche, au cours de la fonctionnalisation. Le ferrocène-aldéhyde n'est visiblement pas immobilisé sur la surface. A la suite de ce test, afin de vérifier la stabilité de la fonction oxyamine, une analyse en spectrométrie de masse du thiol-PEG-ONH₂ **30** a été effectuée et montre bien la présence de l'oxyamine. Afin d'éliminer un problème de contamination par le solvant qui peut s'oxyder et former des groupements carboxyles, un second test de formation de la couche a été effectué entièrement dans le dichlorométhane, toujours sous flux constant d'argon, dans les conditions suivantes. La SAM est formée pendant 1 h à partir d'une solution équimolaire de thiol-PEG-OH et de thiol-PEH-ONH₂ à 3 mM dans le dichlorométhane. Elle est ensuite fonctionnalisée pendant ½ h avec le ferrocène-aldéhyde à 1 mM dans le dichlorométhane.

La Figure 65 présente la courbe de voltamétrie cyclique obtenue dans un électrolyte aqueux à 0,1 M en KPF₆ pour la surface ainsi formée.

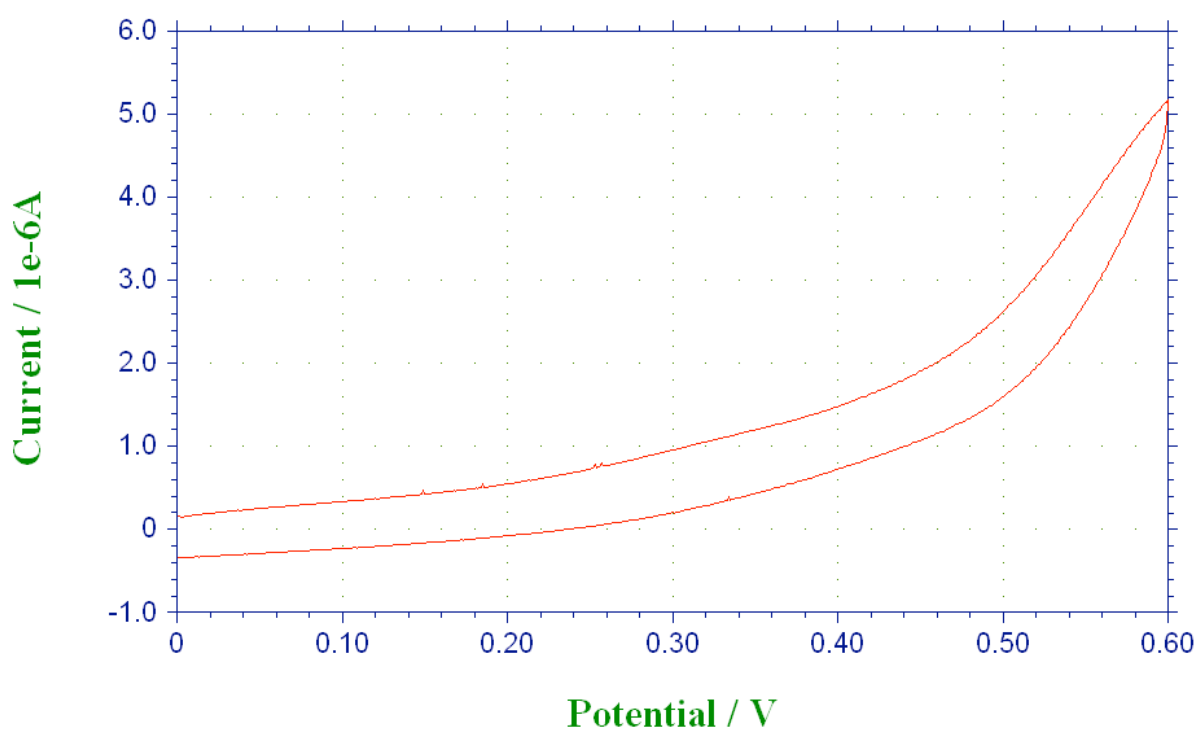


Figure 65 : Courbe de voltamétrie cyclique obtenue dans une solution aqueuse de KPF₆ à 0,1 M pour une surface de ferrocène immobilisé sur la SAM *via* des liens oxime ($V = 20$ mV/s).

La courbe de la Figure 65 ne montre, encore une fois, aucun signal caractéristique du ferrocène. La désorption réductrice de la couche a alors été réalisée pour confirmer la présence des alcanethiols (Figure 66).

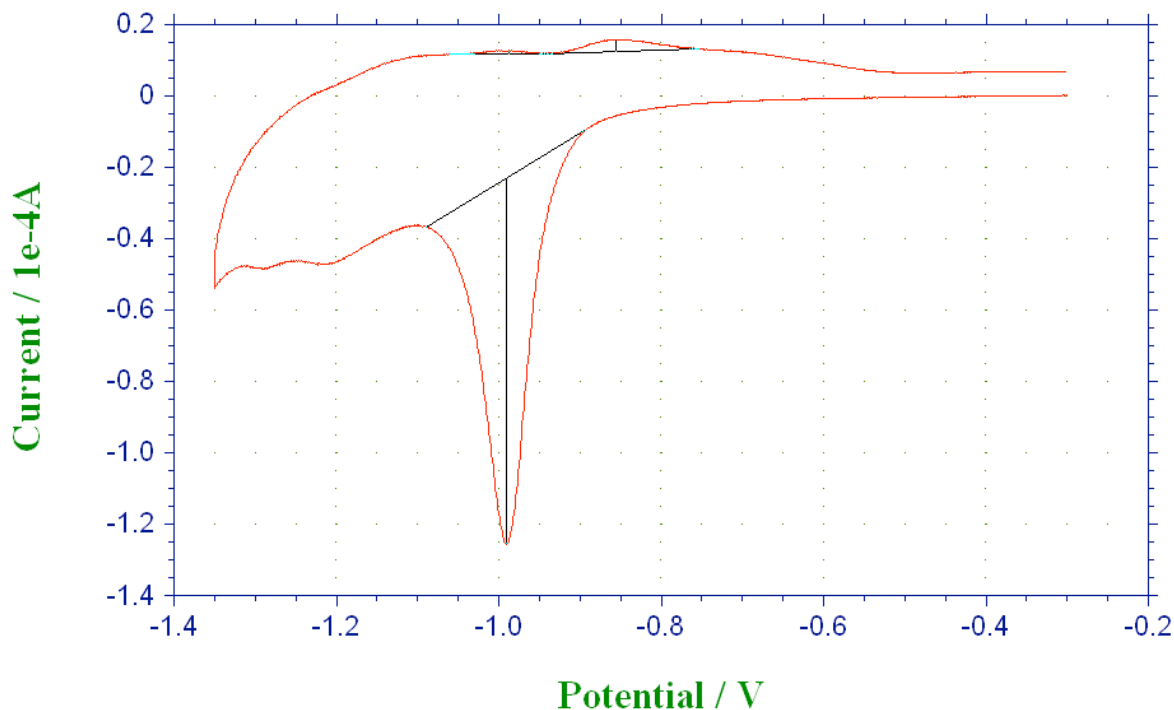


Figure 66 : Signal électrochimique obtenu lors de la désorption réductrice dans NaOH 0,5 M de la couche préalablement formée ($V = 20 \text{ mV/s}$).

La Figure 66 montre un pic de désorption des molécules de thiol vers $-0,99 \text{ V}$. L'intégration du courant de pic donne une densité de greffage d'environ $7,4 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$. Cette valeur est comparable à celle obtenue précédemment et permet donc de conclure également que l'adsorption de la SAM se fait correctement.

La fixation du ferrocène aldéhyde n'étant pas concluant, nous avons décidé de ne pas faire les tests d'adhésion cellulaire sur les surfaces présentant quatre ligands -RGD- avant d'avoir mis au point le greffage covalent par cette procédure de ligation chimiosélective.

c. Conclusion

Les exemples de la littérature ont montré que ce type d'immobilisation sur surface est possible. Cependant dans notre cas, la quantité de ferrocène immobilisée n'est pas suffisante pour être détectée en électrochimie. Pourtant, le greffage de la SAM avec un fort taux de thiol-PEG-ONH₂ (50%) nous permettait d'envisager la détection du signal électrochimique du

ferrocène même si la réaction n'est pas totale. Aucune des tentatives de formation du lien oxime n'a fonctionné. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Les oxyamines ont déjà réagi avec des aldéhydes contaminant. Pourtant des précautions ont été prises pour éviter ces réactions parasites et l'analyse en spectrométrie de masse à plusieurs reprises nous confirme la présence du groupement oxyamine.

- Les groupements oxyamines ne sont pas disponibles pour réagir avec les groupements aldéhydes. Les groupements peuvent être enfouis, repliés dans la couche hydratée de PEG.

Cette méthode de liaison chimio-sélective s'est donc révélée délicate sur surface dans notre cas. De nombreux paramètres sont à prendre en compte et les conditions réactionnelles restent à optimiser.

2. Couplage par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens

a. Introduction

Le deuxième mode d'immobilisation par couplage covalent envisagé est la réaction entre une fonction azoture présentée sur la surface et une fonction alcyne, substituant de la molécule d'intérêt, qui forme un cycle 1,2,3-triazole. Cette cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens catalysée par le cuivre (I) a déjà été utilisée sur surface dans la littérature^{48,161} et au laboratoire¹⁶². C'est une réaction qui a de nombreux avantages^{163,164}. Elle est rapide et efficace, chimiosélective par rapport à la plupart des fonctions que l'on retrouve dans les biomolécules. Elle engage des fonctions stables et facilement introduites dans les biomolécules. Le lien formé est stable dans les conditions biologiques. C. Chidsey en immobilisant des brins d'ADN sur une surface, *via* la réaction de cycloaddition, a montré que les biomolécules ainsi immobilisées gardaient leur fonctionnalité.¹⁶¹ Il a également montré qu'il était possible de contrôler précisément la densité de greffage des biomolécules en faisant varier la densité d'azoture sur la surface.¹⁶⁰ W. Murphy a immobilisé des ligands -RGD- après avoir caractérisé la SAM mixte formée par spectroscopie infrarouge. Il étudie alors, par microscopie de fluorescence, l'influence de la densité de greffage sur l'adhésion, l'étalement cellulaire et la formation de contacts focaux.⁴⁸

Dans notre étude, la fonction azoture est greffée sur la couche par formation d'une SAM mixte d'alcanethiols commerciaux à différentes fractions molaires : thiol-PEG-OH et thiol-

¹⁶¹ Devaraj, N.K. ; Miller, G.P. ; Ebina, W. ; Kakaradov, B. ; Collman, J.P. ; Kool, E.T. ; Chidsey, C.E.D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8600-8601.

¹⁶² Dubacheva, G. ; Coche-Guérente, L. ; Auzely, R. ; Labbé, P. *En préparation*.

¹⁶³ Kolb, H.C. ; Finn, M.G. ; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

¹⁶⁴ Rostovtsev, V.V. ; Green, L.G. ; Fokin, V.V. ; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

PEG-N₃ (Schéma 37). Les expériences seront nommées par le pourcentage de thiol-PEG-N₃ en solution.

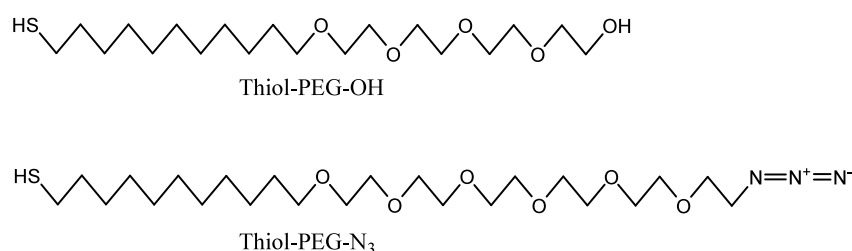


Schéma 37 : Formule développée des alcanethiols utilisés au cours de ce travail.

La SAM est donc formée par la mise en contact de la surface d'or avec une solution d'alcanethiol dans l'éthanol pendant quinze heures. La réaction de couplage du ligand **34** préalablement synthétisé est ensuite effectuée via sa fonction alcyne. Le Schéma 38 rappelle la formule de la molécule **34** ainsi qu'une représentation schématique de l'assemblage de la couche de reconnaissance.

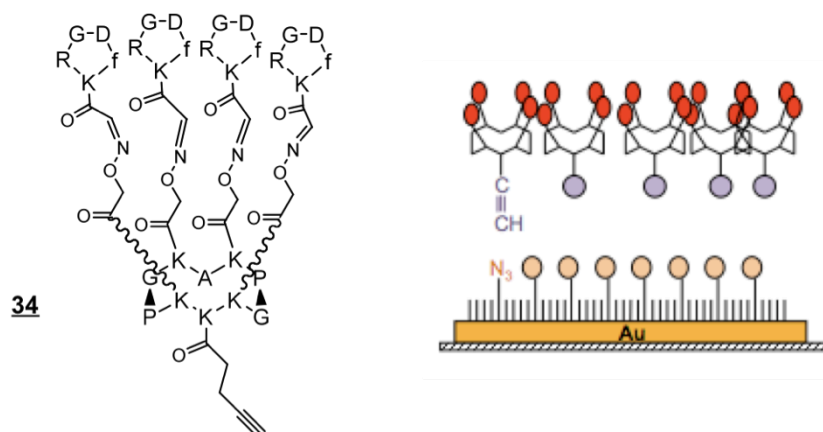


Schéma 38 : Formule de la molécule **34 et schéma de la construction de la couche moléculaire présentant quatre ligands -RGD-.**

Le milieu réactionnel utilisé dans ce travail est donc composé, en plus de la molécule portant la fonction alcyne, de sulfate de cuivre (Cu(II)), d'un excès d'ascorbate de sodium qui permet de réduire le Cu(II) en Cu(I) et de ligand TBTA (Tris-[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine, Schéma 39).

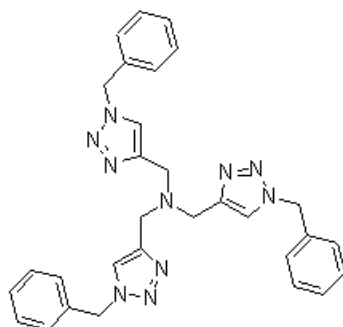


Schéma 39 : Formule développée du ligand TBTA (Tris-[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine)

Ce ligand triazole permet de stabiliser le Cu(I) sans empêcher ses propriétés catalytiques et ainsi d'éviter la dismutation spontanée en Cu(0) et Cu(II). La réaction de cycloaddition est ici catalysée par le Cu(I) pour optimiser les rendements et permettre un couplage régiosélectif. En effet, la cycloaddition, telle qu'elle a été décrite par R. Huisgens,¹⁶⁵ n'est pas sélective avec la formation d'un mélange 1,4- et 1,5-régioisomères et nécessite des conditions de température élevée ainsi que des temps de réaction longs (Schéma 40).

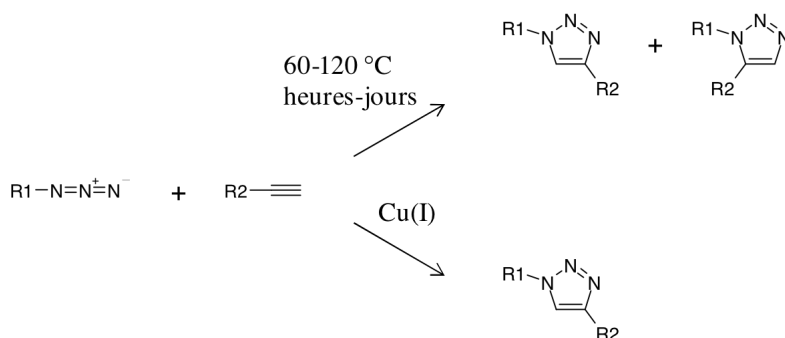


Schéma 40 : La cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne.

L'utilisation de sels de cuivre (I) dans cette réaction a finalement permis d'accélérer la réaction et de former sélectivement le régioisomère 1,4-disubstitué.^{164,166} Dans le cas des peptides, cette réaction est cependant limitée à des molécules ne contenant pas d'histidine, ce résidu pouvant être oxydé par le cuivre.¹⁶⁷

Le milieu réactionnel est maintenu en contact avec la surface présentant les fonctions azoture pendant cinq heures. Un temps de contact inférieur ne permet pas d'obtenir un rendement maximal de la réaction de couplage.

¹⁶⁵ Huisgens, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 75, 604-637.

¹⁶⁶ Tornøe, C.W. ; Christensen, C. ; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.

¹⁶⁷ Cheng, R.Z. ; Uchida, K. ; Kawakishi, S. *Biochem. J.* **1992**, 285, 667-671.

b. Mise au point du mode opératoire de formation de la couche de reconnaissance

La capacité de formation du lien triazole par la SAM fonctionnalisée par des fonctions azoture est évaluée par voltamétrie cyclique après couplage d'une sonde redox, le ferrocène-alcyne. Comme précédemment l'utilisation de la sonde redox ferrocène permet de quantifier le nombre de sites azoture ayant réagi sur la surface. La Figure 67 présente la voltamétrie cyclique dans un électrolyte aqueux à 0,1 M en KPF_6 d'une surface de ferrocène greffé sur une couche auto-assemblée à partir d'une solution contenant 30% de thiol-PEG- N_3 .

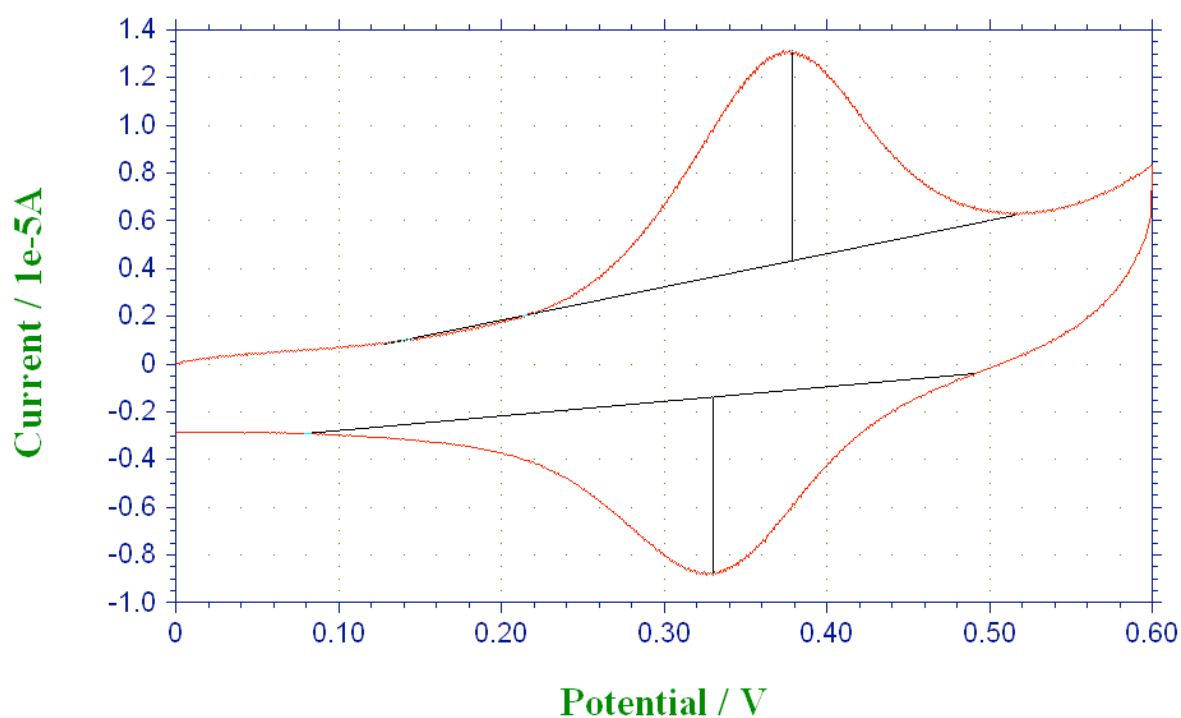


Figure 67 : Courbe de voltamétrie cyclique obtenue dans une solution aqueuse de KPF_6 à 0,1 M pour une surface de ferrocène immobilisé sur la SAM présentant 30% de thiol-PEG- N_3 via une cycloaddition 1,3-dipolaire ($v = 100$ mV/s).

Sur la Figure 67, l'intégration du pic d'oxydation permet de déterminer une concentration surfacique en ferrocène de $1,2 \cdot 10^{-10}$ mol/cm². Dans la littérature, on trouve que le taux de recouvrement théorique de la surface pour une SAM-Ferrocène 100% est de $4,5 \cdot 10^{-10}$ mol.cm².¹⁶⁸ A partir de cette valeur, on peut déduire un taux de recouvrement des groupements ferrocène de 27% dans notre cas.

¹⁶⁸ Chidsey, C.E.D. ; Bertozzi, C.R. ; Putvinski, T.M. ; Mujisce, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4301-4306.

Nous avons ensuite cherché à diminuer la quantité de thiol-PEG-N₃ dans la couche afin de diminuer le taux de greffage. La Figure 68 présente la voltamétrie cyclique de la sonde ferrocène greffée sur la couche assemblée à partir d'une solution contenant 8% de thiol-PEG-N₃.

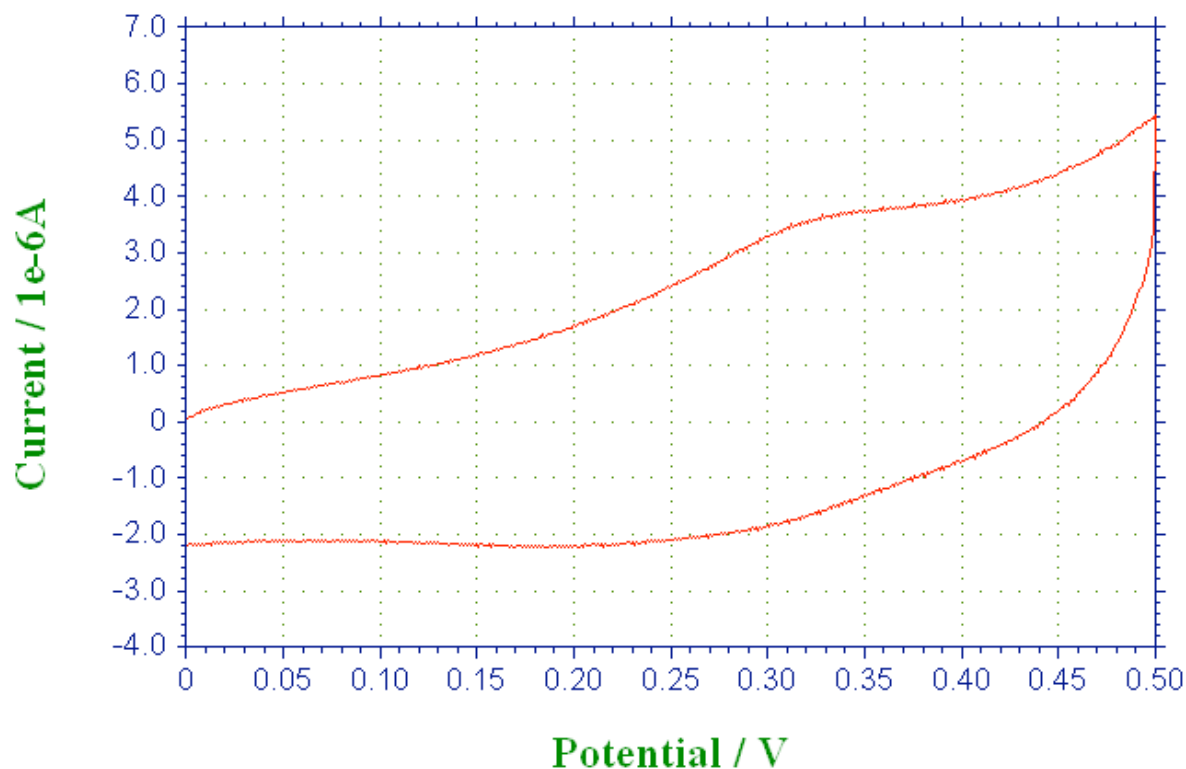


Figure 68 : Courbe de voltamétrie cyclique obtenue dans une solution aqueuse de KPF₆ à 0,1 M pour une surface de ferrocène immobilisé sur la SAM présentant 8% de thiol-PEG-N₃ *via* une cycloaddition 1,3-dipolaire ($v = 100$ mV/s).

Le voltamogramme de la Figure 68 montre un pic d'oxydation très peu marqué. La quantité de ferrocène immobilisé sur la surface est donc très faible. L'intégration manuelle du pic d'oxydation donne une quantité d'électricité de $5,4 \cdot 10^{-7}$ C ce qui correspond à un taux de recouvrement de ferrocène de 1,3%. Ce résultat est effectivement faible par rapport au 8% de molécules de thiol-PEG-N₃ en solution. Il y aurait donc une préférence d'adsorption pour les thiol-PEG-OH, accentuée à faible pourcentage de thiol-PEG-N₃ en solution. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés au laboratoire qui montrent une courbe sigmoïdale pour l'évolution du taux de recouvrement en ferrocène en fonction du pourcentage de thiol-PEG-N₃ dans la solution de thiol (Figure 69).¹⁶²

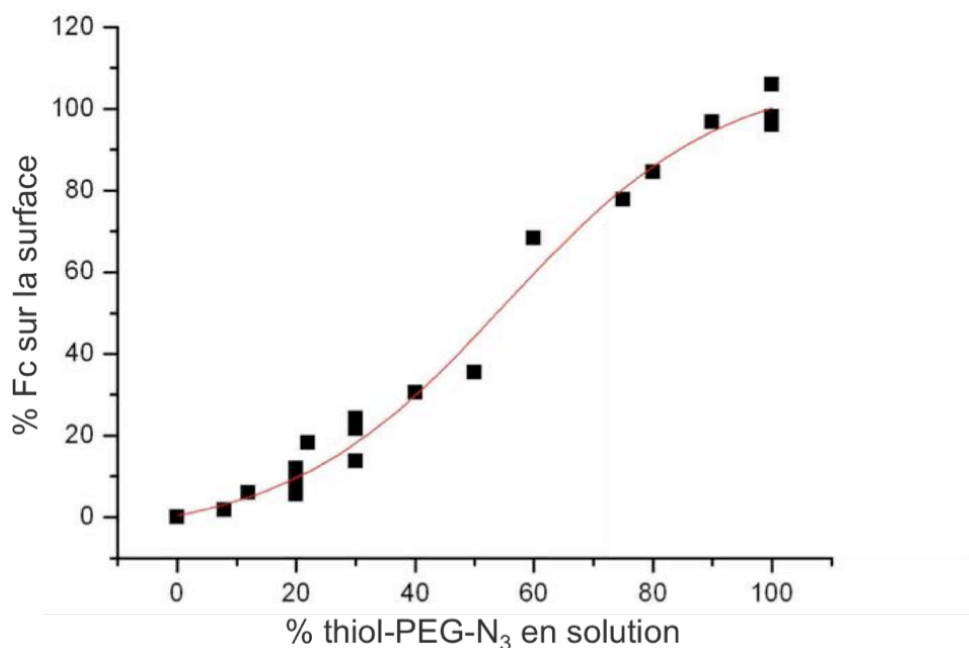


Figure 69 : Evolution du pourcentage de ferrocène immobilisé sur la surface en fonction de la quantité de thiol-PEG-N₃ dans la solution utilisée pour former la SAM.

Les tests d'adhésion cellulaire présentés ensuite ont été réalisés avec des pourcentages de thiol-PEG-N₃ en solution compris entre 0,01 et 5%. Ces pourcentages ont été choisis en fonction des travaux de W. Murphy qui montrent que 0,01% de groupements azoture dans la SAM, substitué par des ligands -RGD linéaire monovalent, suffisent pour observer de l'adhésion cellulaire sur la surface.⁴⁸ Le même protocole que celui que nous venons de présenter a été appliqué par la suite pour greffer la molécule **34** sur la SAM présentant différents pourcentages de thiol-PEG-N₃.

c. Tests d'adhésion cellulaire

Des tests d'adhésion cellulaire ont été effectués sur des surfaces présentant différentes densités de greffage en ligand -RGD-. Les cellules utilisées sont des HEK-β3 qui surexpriment l'intégrine α_vβ₃ et sont en suspension dans le DMEM, sans facteur de croissance. Des SAM ont été préparées à partir de solution contenant différentes fractions molaires de thiol-PEG-OH et de thiol-PEG-N₃. Le greffage des molécules **34** préalablement synthétisées et présentant quatre ligands -RGD- est ensuite effectué en présence de Cu(I) selon le protocole décrit précédemment. L'adhésion cellulaire sur les différentes surfaces a ensuite été évaluée par QCM-D en flux. La Figure 70 présente les variations de fréquence et les variations de dissipation d'énergie obtenues lors des tests d'adhésion cellulaire sur des SAM préparées à partir de 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1% et 5% de thiol-PEG-N₃ en solution.

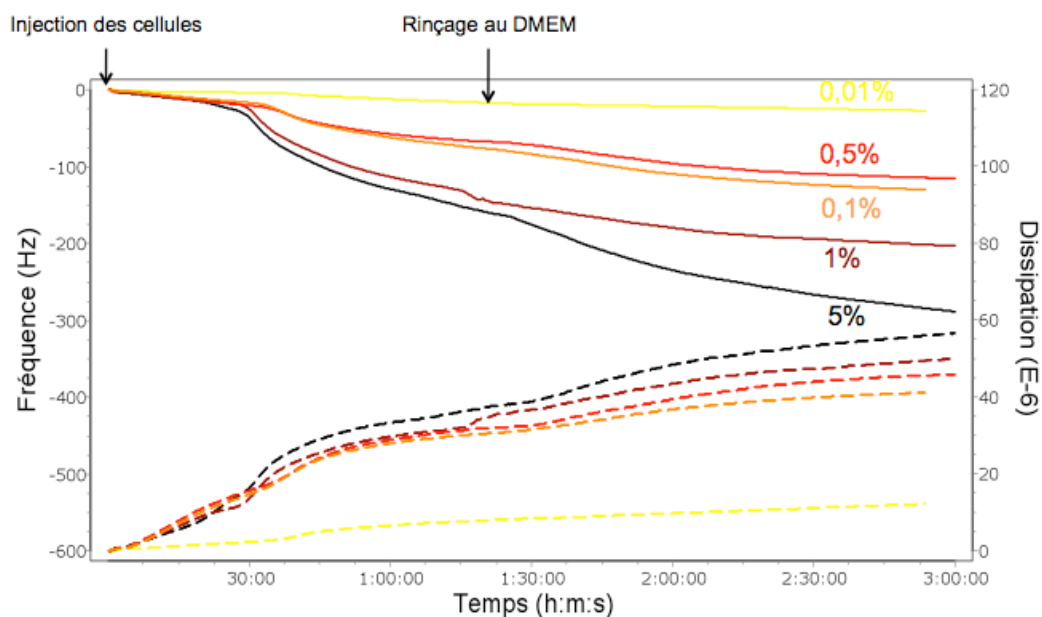


Figure 70 : Variations de fréquence (traits pleins) et de dissipation (traits pointillés) pour la 9^{ème} harmonique, obtenues lors des tests d'adhésion cellulaire sur des surfaces présentant différentes fractions molaires de thiol-PEG-N₃ ayant réagi avec la molécule d'intérêt 34.

La Figure 70 indique les variations de fréquence (traits pleins) et de dissipation (traits pointillés) après injection des cellules puis lors du rinçage au DMEM. Elle permet donc de suivre l'évolution de l'adhésion et de l'étalement cellulaire sur les surfaces présentant différents taux de greffage de ligands -RGD-. Globalement, on observe une augmentation de ΔF_{\max} et ΔD_{\max} lorsque l'on augmente la quantité de ligand sur la surface, malgré une inversion entre 0,1% et 0,5%, ce qui indique donc une augmentation de l'adhésion et de l'étalement cellulaire. Il est intéressant de noter les très fortes variations de fréquence et de dissipation observées ($\Delta F_{\max} = 290$ Hz et $\Delta D_{\max} = 58.10^{-6}$ pour une surface à 5% de thiol-PEG-N₃). On peut donc poser l'hypothèse d'un très grand nombre de cellules adhérentes sur la surface ou d'un étalement important des cellules.

Ces résultats préliminaires peuvent être comparés à ceux obtenus par W. Murphy publié en mars 2009 sur des surfaces présentant des ligands -RGD- linéaires monovalents immobilisés par cycloaddition sur une SAM (Figure 71)⁴⁸.

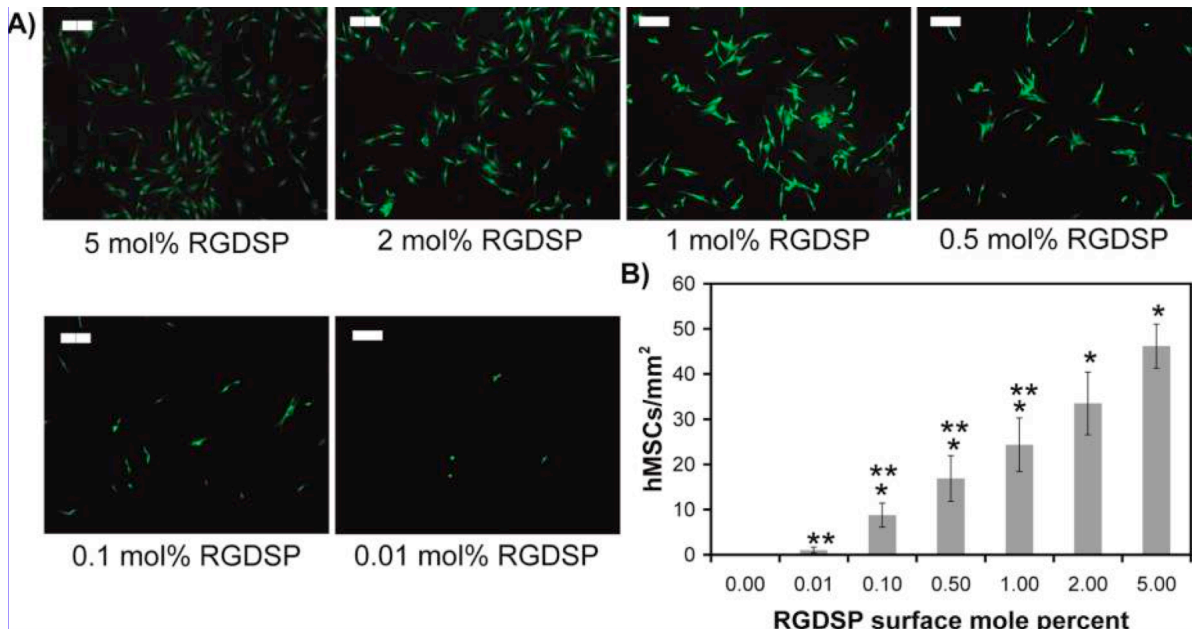


Figure 71 : Etude de l'adhésion cellulaire sur des surfaces présentant des ligands -RGD- linéaires sur des SAMs. A) Clichés de microscopie de fluorescence après 24 h de contact des cellules avec la surface, les barres d'échelle représente 200 nm; B) Courbe du nombre de cellules sur la surface par mm² en fonction de la densité de greffage en -RGD-⁴⁸

La Figure 71A montre que les cellules adhèrent sur la surface dès 0,01% de ligands sur la surface et s'étalent correctement dès 0,5% de ligands. La Figure 71B montre que le nombre de cellules sur la surface augmente de façon quasi proportionnelle avec la quantité de molécule -RGD- sur la surface.

Au vu de nos résultats préliminaires et de ce qui a été publié dans la littérature, il serait donc intéressant d'observer les cellules par microscopie optique pour étudier leur comportement sur ce type de surface et mesurer leur étalement en fonction de la densité de greffage en ligand. La réalisation de tests de contrôle avec des cellules HEK-β1, qui ne reconnaissent pas le ligand -RGD-, serait également intéressante afin de confirmer la spécificité de l'adhésion des cellules.

d. Conclusion

Les premiers résultats d'adhésion cellulaire sur ces surfaces sont concluants. Il serait intéressant de tester une molécule non reconnaissante pour s'assurer que la procédure de greffage des ligands ne provoque pas d'adhésion cellulaire non spécifique. La surface présentant les fonctions azoture serait fonctionnalisée par un cyclodécapeptide alcyne présentant les molécules -RAD-. Cette molécule, portant à une β-alanine à la place de la

glycine du ligand -RGD- n'est pas reconnue par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et pourrait donc être utilisée pour ce test.

En revanche, les résultats obtenus par électrochimie lors de la caractérisation de la couche montrent qu'il est difficile d'estimer la quantité de ligand immobilisé à faible pourcentage par voltamétrie cyclique. De plus, il est difficile d'être sûr que tous les sites azoture réagissent avec les groupements alcyne. Il est alors envisageable de greffer toujours la même fraction molaire de thiol-PEG-N₃ et d'immobiliser ensuite un mélange de ligand reconnaissant et de ligand non reconnaissant avec des structures les plus proches possible pour qu'il n'y ait pas de différence de réactivité. Un cyclodécapeptide présentant une fonction alcyne d'une part et quatre molécules -RAD- d'autre part pourrait par exemple être utilisé dans ce but. La variation de quantité de ligand sur la surface serait alors due à la variation de la fraction molaire en solution de ligand reconnaissant.

V. Comparaison des différentes techniques de couplage

Trois techniques d'immobilisation des ligands -RGD- ont été présentées dans ce chapitre. Pour chaque méthode, des tests d'adhésion cellulaire ont été effectués après avoir caractérisé la couche de reconnaissance.

Dans le cas de l'immobilisation par couplage affiné, les problèmes d'adhésion non spécifique rencontrés à un pourcentage élevé d'immobilisation du ligand ont été résolus en diminuant fortement le taux de streptavidine et donc de ligands sur la surface. Les calculs effectués pour déterminer le nombre de ligands nécessaires à l'adhésion et à l'étalement cellulaire se sont révélés compliqués, avec plusieurs hypothèses, du fait de la nature tétramérique de la streptavidine, du taux d'hydratation de la couche de protéine et de l'étape supplémentaire par rapport à un couplage direct. Les hypothèses posées pour ces calculs ont cependant permis d'obtenir des valeurs comparables à celles de la littérature et à des valeurs théoriques idéales.

L'immobilisation dans une bicouche lipidique a également permis de déterminer l'espacement entre les ligands nécessaire à l'adhésion et à l'étalement. Avec cette technique, les ligands sont mobiles sur la surface ce qui permet donc d'être plus proche d'un modèle biologique. Cependant, des problèmes de stabilité de la bicouche lors du contact des cellules avec la surface ont été observés ; cela nécessiterait des études complémentaires axées sur l'influence de la rigidité de la bicouche.

Enfin, deux techniques d'immobilisation par couplage covalent ont été testées. L'intérêt de ce mode d'immobilisation est la possibilité de déterminer par électrochimie le nombre de ligand sur la surface en immobilisant une sonde redox. L'immobilisation par formation d'un lien oxime n'a pas donné de résultat probant, l'espèce électroactive n'est pas détectée montrant que la réaction à la surface entre l'oxyamine et l'aldéhyde ne se fait pas. L'immobilisation par cycloaddition 1,3-dipolaire a donné des résultats préliminaires intéressants avec les tests d'adhésion cellulaire. Nous avons montré que la diminution du nombre de ligands sur la surface est difficilement envisageable par diminution des sites de greffage mais devra plutôt être envisagé par dilution avec un ligand non reconnaissant. Ces résultats sont donc des travaux préliminaires mais prometteurs qu'il conviendra d'étudier de façon plus approfondie par la suite.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était de développer une méthodologie d'étude des interactions ligand/récepteur. Le système modèle utilisé pour ces études a concerné les interactions entre un ligand peptidique de séquence -RGD- et un récepteur cellulaire, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, exprimé à la surface des cellules. Dans ces travaux, les ligands peptidiques sont présentés de façon multivalente sur un châssis cyclodécapeptidique et fixés à la surface d'un transducteur.

La partie synthèse de ces travaux a permis d'obtenir les différentes molécules présentant le ligand cyclopentapeptidique -RGD- et fonctionnalisées avec les groupements précurseurs à leur immobilisation sur les surfaces. L'utilisation d'acides aminés modifiés au cours de la synthèse en phase supportée a permis une première optimisation des rendements obtenus. L'introduction de ces acides aminés modifiés dans la synthèse du cyclodécapeptide biotinylé et la mise au point d'une autre méthode de purification que la CLHP notamment pour les lipopeptides permettraient encore d'améliorer les rendements.

Nous avons testé trois méthodes de couplage des ligands sur les surfaces : le couplage affiné *via* l'interaction streptavidine/biotine, l'insertion dans une bicouche lipidique et le couplage covalent *via* un lien oxime ou *via* une cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (I). Chaque type d'immobilisation a d'abord été caractérisé par des méthodes de caractérisation physico-chimique de surfaces et d'interfaces comme l'électrochimie, l'ellipsométrie, les mesures d'angle de contact ou la microbalance à quartz. Des tests d'adhésion cellulaire ont ensuite permis de mettre en évidence les propriétés de reconnaissance des ligands immobilisés sur les surfaces de cristaux de quartz piézoélectriques permettant de suivre le processus d'adhésion par QCM-D et par microscopie optique. Ces travaux ont contribué à améliorer l'interprétation des signaux de QCM-D lors de l'adhésion cellulaire sur des surfaces spécifiques par rapport aux résultats de la littérature. Nous avons notamment mis en évidence une évolution des signaux de QCM-D en fonction de la densité de greffage des ligands sur la surface qui est corrélée à l'étalement des cellules.

Au vu des problèmes rencontrés dans ces travaux, en particulier l'adhésion non spécifique sur les plateformes de streptavidine, la formation de clusters de huit à douze ligands inhérent au couplage affiné et le manque de stabilité de la bicouche lors des tests d'adhésion cellulaire, la perspective de ces travaux serait d'approfondir l'immobilisation par couplage covalent. Cette méthode de fonctionnalisation de surface permettrait de s'affranchir

de l'adhésion non spécifique et conduirait à une répartition homogène des ligands sur la surface sans formation de cluster. Ce mode de greffage pourrait finalement être utilisé pour tester et caractériser les propriétés de reconnaissance de nouveaux ligands actuellement mis au point au laboratoire.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

I. Synthèse

Nous avons pris la liberté de décrire la partie expérimentale de synthèse de ce manuscrit en anglais. Ce document pourra alors être employé par tous les utilisateurs du laboratoire, y compris les collaborateurs étrangers, et constitue par ailleurs un outil profitable pour la rédaction des publications relatant nos travaux.

1. Materials and Equipments

Protected amino acids were obtained from Activo tec, Bachem Biochimie SARL, France Biochem SA, Merck Eurolab or Calbiochem-Novabiochem. PyBOP[®] was purchased from Calbiochem-Novabiochem and PyAOP[®] from PerSeptive Biosystems. Rink-amide MBHA[®] and NovaSyn[®] TGR resin were obtained from Calbiochem-Novabiochem, Fmoc-Gly-SASRIN[®] resin from Bachem Biochimie SARL and 2-chlorotritylchloride[®] resins from Advanced ChemTech Europe. Other reagents were obtained from Aldrich and Acros. Biotine was purchased from Avocado Research Chemicals.

RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters In-Line Degasser. The analytical column used was the Nucleosil 120 Å 3 µm C18 particles, 30 × 4 mm² operated at 1.3 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 15 min run time (classical program 5 to 100 % B in 15 min). UV monitoring was performed most of the time at 214 nm and 250 nm. Solvent A consisted of H₂O containing 0.1% TFA and solvent B of CH₃CN containing 9.9% H₂O and 0.1% TFA. Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system. CH₃CN and TFA were of HPLC use quality. RP-HPLC purifications were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Degassing of solvents was performed with 50 mL.min⁻¹ nitrogen. The preparative column, Delta-Pak[™] 300 Å 15 µm C18 particles, 200 × 25 mm² was operated at 22 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time. Solvents A and B were the same than the ones used in RP-HPLC analysis.

Electron spray ionization (ESI-MS) mass spectra were obtained on an Esquire 3000 (Bruker). NMR spectra were recorded on BRUKER Avance 300 spectrometers. Chemical shifts are expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference.

2. General Procedures for Syntheses of Peptides

Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard Fmoc/*t*Bu protection strategy. In manual SPPS, device consisted in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated overnight with (CH₃)₂SiCl₂ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH₂Cl₂ until complete acid trace clearance. At the beginning of the synthesis and after each ether

washing, the resin was washed and swollen twice with CH₂Cl₂ (20 mL/g resin) for 15 min and once with DMF (20 mL/g resin) for 15 min. Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5-2 eq. of *N*_α-Fmoc-protected amino acid *in situ* activated with 1.5-2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The resin was then washed twice with DMF (20 mL/g resin) for 1 min and twice with CH₂Cl₂ (20 mL/g resin) for 1 min. The completeness of amino acid coupling reaction was checked by two tests: Kaiser and TNBS.

Kaiser test required :

- a Ninhydrine (500 mg) solution in 10 mL EtOH,
- a Phenol (80 g) solution in 20 mL EtOH,
- 2 mL of a KCN 1 mM solution diluted in 100 mL Pyridine.

Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was heated at 80-110°C for 3 min. Remaining of free amino functions resulted in a blue coloration of the resin beads (positive Kaiser test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative Kaiser test).

TNBS test required :

- a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF,
- a solution of DIEA/DMF (1:9).

Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at r.t. for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a bright orange-red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test).

*N*_α-Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated three times and the resin was further washed five times with DMF (10 mL/g resin) for 1 min. The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299$ nm, $\epsilon = 7800$ M⁻¹.cm⁻¹). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value (V) with MeOH. Absorbance of this solution at 299 nm gave the amount of Fmoc protecting groups released from the cleavage according to the Beer-Lambert relation:

$$n_{\text{Fmoc}} = (\text{OD}_{299\text{nm}} \times V) / (\epsilon_{299\text{nm}} \times l) \quad \text{with } l = \text{length of optical path.}$$

This method was commonly used for the following of SPPS and to determine, in an indirect manner, the loading of the resin.

Automated syntheses of peptide are performed on ABI 433 A1 Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) using standard solid-phase methods or on 348 Ω Synthesizer (Advance ChemTech) using the same conditions as manual procedure.

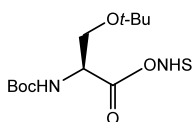
Synthetic linear peptides were recovered directly upon repeated acid cleavage of the resins according to the following conditions:

- The peptide on resin 2-chlorotritylchloride[®] was cleaved by a solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99) at 10 mL/g resin during 2x5 min or by a solution of TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2/1/7) at 10 mL/g resin during 2 h.
- The peptide on resin SASRIN[®] resin was cleaved by a solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99) at 10 mL/g resin during 3 min 5 to 7 times.

- The peptide on resin Rink-amide MBHA was cleaved by a solution of TFA/TIS/H₂O (90/5/5) at 10 mL/g resin during 2 h.

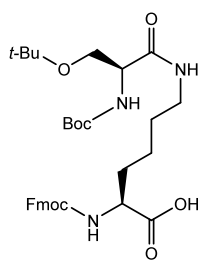
Cyclization reactions of peptides in solution are performed using protected linear peptides. They were dissolved in DMF (0.5 mM) and the pH of the solution was adjusted to 8-9 by addition of DIEA. PyBOP (1.1 or 1.2 eq.) was added and solution was stirred at r.t. for at least 30 min. Solvent was removed under reduced pressure and residue dissolved in the minimum of CH₂Cl₂. Ether was added to precipitate the peptide. The latter was triturated and washed three times with ether affording crude material, which was, most of the time, further used without additional purification.

Molecular weights of compounds were calculated as TFA salts (one TFA salt (114 g.mol⁻¹) by free amine).



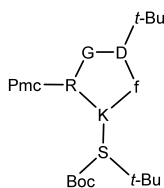
1 : Boc-Ser(*t*Bu)-NHS

To a stirred solution of Boc-Ser(*t*Bu)-OH (2.8 g, 10 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.2 g, 10.7 mmol) in EtOAc/dioxan (1:1, 100 mL) cooled on ice bath were added DCC (2.2 g, 10.7 mmol). After 5 hrs stirring at r.t. the reaction mixture was filtered through a pad of Celite with EtOAc and the collected filtrate was concentrated in vacuum. The obtained oily residue was taken into 150 mL ethyl acetate and washed with 5 % aqueous NaHCO₃ (2 x 70 mL), water (2 x 70 mL) and brine (2 x 70 mL). The organic fraction was then dried over Na₂SO₄. Boc-Ser(*t*Bu)-NHS **1** was obtained as a white powder after evaporation of the solvent (3.5 g, 9.8 mmol, 98%). ESI-MS (M+H)⁺ calc 359.2, found 359.3; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.41 (1H, d, J = 9.0 Hz), 4.78 (1H, d, J = 9.0 Hz), 3.92 (1H,m), 3.66 (1H, m), 2.82 (4H, s), 1.46 (9H, s), 1.20 (9H, s)



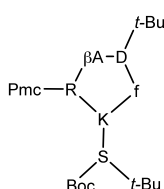
2 : Fmoc-K[Boc-S(*t*Bu)]-OH

The above Boc-S(*t*Bu)-NHS **1** (8.00 g, 22.3 mmol) in CH₂Cl₂ (75 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of finely powdered TFA-salt of Fmoc-lysine (10.90 g, 22.6 mmol) and DIEA (15.6 mL, 90.0 mmol) in CH₂Cl₂ (130 mL). After 5 hrs of reaction, the solvent was evaporated off in vacuum and the remaining residue was dissolved in EtOAc (400 ml), followed by washing with 10 % aqueous citric acid solution (70 ml), water (2 x 100 ml), and finally brine (100 mL). The organic fraction was dried over Na₂SO₄ and evaporation under vacuum gave 11.85 g of a white solid. This solid was recrystallized from CH₂Cl₂ with a hexane-diethyl ether solution (95/5) giving Fmoc-K[Boc-S(*t*Bu)]-OH **2** as a pure white powder (8.94 g, 14.6 mmol, 66%). ESI-MS (M+H)⁺ calc for 612.3, found 612.2; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.68 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.55 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.33-7.18 (4H, m), 6.84 (1H, broad s), 6.25 (1H, broad d), 5.62 (1H, broad s), 4.34-4.06 (5H, m), 3.63 (1H, m), 3.36 (1H, m), 3.20-3.05 (2H, m), 1.84 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.47-1.32 (14H, m), 1.09 (9H, s).



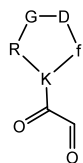
3 : c[-R(Pmc)-G-D(tBu)-f-K(Boc-S(tBu))-]

The linear pentapeptide was assembled on Fmoc-G-SASRIN[®] resin (2.0 g, loading of 0.69 mmol/g) using the general procedure with amino acid **2**. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99). The free linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification. The crude linear peptide (142 mg, 0.14 mmol) was dissolved in 16 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIEA. PyBOP (125 mg, 0.24 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the peptide was precipitated, triturated and washed with diethyl ether. Crude product **3** (163 mg, 0.14 mmol) was obtained as a white powder and further used without additional purification. ESI-MS (M+H)⁺ calc 1169.6, found 1169.2.



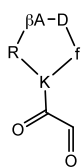
4 : c[-R(Pmc)-betaA-D(tBu)-f-K(Boc-S(tBu))-]

The linear pentapeptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (2 g, loading of 1.4 mmol/g) using the general procedure and amino acid **2**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-betaAla-OH) through nucleophilic substitution was performed following the procedure given by Advanced ChemTech and yielding to a convenient resin loading of 0.9 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFA/CH₂Cl₂ (1/99). The free linear protected peptide was obtained as a white solid powder (1.26 g, 0.96 mmol) after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. This crude material was used without further purification. The crude linear peptide (303 mg, 0.29 mmol) was dissolved in 30 mL of DMF and the pH was adjusted to 9 with DIEA. PyBOP (194 mg, 0.37 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the peptide was precipitated, triturated and washed with diethyl ether. Crude product **4** (340 mg, 0.29 mmol) was obtained as a white powder and further used without additional purification. ESI-MS (M+H)⁺ calc 1183.6, found 1183.2.



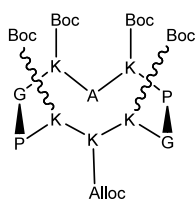
5 : c[-R-G-D-f-K(COCHO)-]

The cyclopeptide **3** (770 mg, 0.66 mmol) was treated in 66 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The product was concentrated under reduced pressure. Precipitation and work-up in diethyl ether afforded the deprotected peptide as a white solid powder (603 mg, 0.66 mmol). This crude material was used without further purification. The deprotected peptide (120 mg, 0.131 mmol) and NaIO₄ (282 mg, 1.32 mmol) were dissolved in 12 mL of water. The mixture was stirred for 20 min and the product was purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **5** as a white powder (85 mg, 0.110 mmol). ESI-MS (M+H)⁺ calc 660.3, found 660.4.



6 : c[-R-βA-D-f-K(COCHO)-]

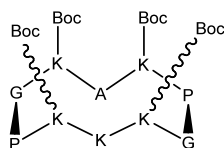
The cyclopeptide **4** (1093 mg, 0.92 mmol) was treated in 66 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 1 hr at r.t. The product was concentrated under reduced pressure. Precipitation and work-up in diethyl ether afforded the deprotected peptide as a white solid powder (857 mg, 0.92 mmol). This crude material was used without further purification. The deprotected peptide (80 mg, 0.086 mmol) and NaIO₄ (184 mg, 0.86 mmol) were dissolved in 8 mL of water. The mixture was stirred for 20 min and the product was purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **6** as a white powder (51 mg, 0.065 mmol). ESI-MS (M+H)⁺ calc 674.3, found 674.6.



7 : c[K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G]

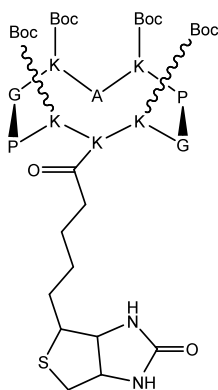
The linear peptide H-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-OH was assembled on Fmoc-G-SASRIN[®] resin (500 mg) affording 467 mg (0.3 mmol) of a white solid powder. The cyclization reaction was carried out using linear peptide (467 mg, 0.3 mmol) as described above to obtain the peptide **7**. This crude material was used without further

purification.



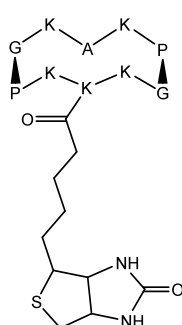
8 : c[K(Boc)-K-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G]

Alloc group was removed using cyclic peptide **7** (100 mg, 63 μmol) dissolved in 5 mL of dry CH₂Cl₂ under argon by adding phenylsilane (330 μl, 2.7 mmol) for 3 min and then Pd(PPh₃)₄ (12.4 mg, 10 μmol) for 1 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in the minimum of a solution containing a mixture of CH₂Cl₂ and methanol (1:1). Ether was added to precipitate the crude product. Then it was triturated and washed 3 times with ether. The product **8** is obtained as a white powder. This crude material was used without further purification.



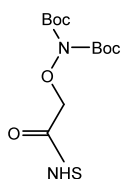
9 : c[K(Boc)-K(biotin)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G]

Biotin (15 mg, 60 μ mol), PyBOP (33 mg, 60 μ mol), and DIEA were added to a solution containing the compound **8** (96 mg (th), 60 μ mol) in 6 mL of DMF to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and then concentrated under diminished pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound **9** as a white powder. This crude material was used without further purification.



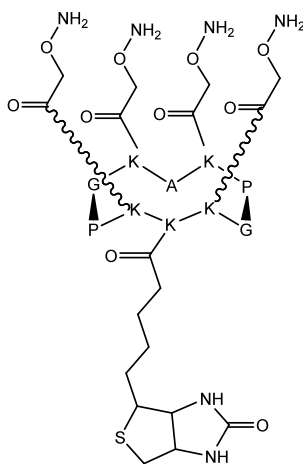
10 : c[K-K(biotin)-K-P-G-K-A-K-P-G]

Removal of Boc moieties of compound **9** was carried out in a solution containing 50% TFA in CH_2Cl_2 for 1 h at room temperature. The crude product was concentrated, triturated, and washed with diethyl ether to yield compound **10** as a white powder (118 mg, 69 μ mol, quantitative yield).



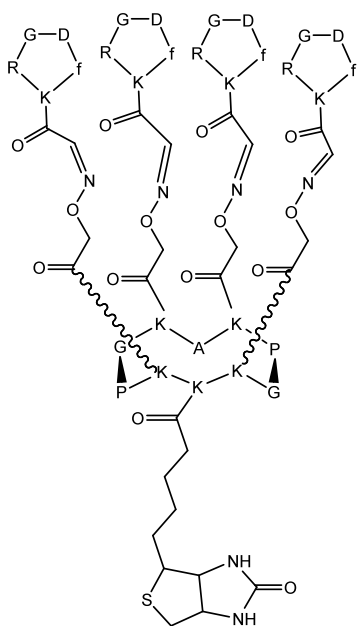
11 : (Boc)₂NOCH₂-CO-NHS

Bis(*Tert*-Butyloxycarbonyl)-aminoxyacetic acid (4.1 g, 21.44 mmol) was dissolved in EtOAc/Dioxane (60 mL, 1/1) and cooled at 0 °C. *N*-hydroxysuccinimide (2.46 g, 21.44 mmol) and DCC (4.4 g, 21.32 mmol) were added. Instantaneously, DCU precipitate was formed. The reaction mixture was stirred for 5 hr at r.t.. DCU was eliminated by filtration and solvents were evaporated under vacuum. EtOAc (150 mL) was added to residue and organic solution was washed with aqueous solution of 5% NaHCO_3 (4 X 60 mL) and water (4 X 60 mL). The EtOAc phase was dried over Na_2SO_4 , evaporated and precipitate in diethyl ether to yield a crude product **11** as white powder (2.91 g, 10.14 mmol). This crude material was used without further purification.



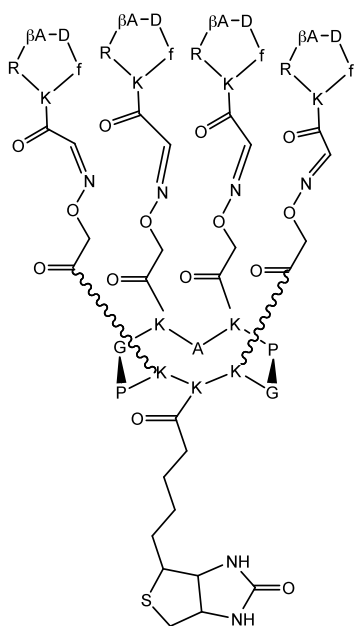
12 : c[K(CO-CH₂ONH₂)-K(biotin)-K(CO-CH₂ONH₂)-P-Gly-K(CO-CH₂ONH₂)-A-K(CO-CH₂ONH₂)-P-G]

(Boc)₂NOCH₂-CO-NHS **11** (60 mg, 150 μmol) and DIEA were added to a solution of compound **10** (50 mg, 37 μmol) in 8 mL of DMF to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 30 min at room temperature and then concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with diethyl ether to yield protected compound as a white powder. ESI-MS, calcd 2338.2, found 2377.3 (M + K)⁺. Removal of Boc moieties from previous compound was carried out in a solution containing CH₂Cl₂/TFA/TIS/H₂O (40/50/5/5) for 1 h at room temperature. The crude product was concentrated and then purified by RP-HPLC to afford compound **12** as a white powder (12 mg, 7.8 μmol, 21% in two steps). ESI-MS (M+H)⁺ calc 1538.8, found 1538.9.



13 : « biotin-cyclodecapeptide-(RGD)₄ »

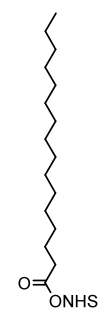
To a solution containing the derivative **12** (15 mg, 9.1 μmol) in 1 mL of water/CH₃CN (1:1) was added the peptide **5** (26.3 mg, 40 μmol). The reaction was stirred for 5 h at 25 °C. Conjugate **13** was isolated after purification by RP-HPLC as a white powder (25 mg, 6.1 μmol, 60%). ESI-MS (M+H)⁺ calc 4103.9, found 4103.9.



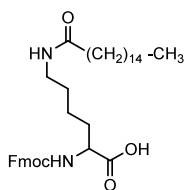
14 : « biotin-cyclodecapeptide-(RAD)₄ »

To a solution containing the derivative **12** (16 mg, 9.7 μmol) in 1 mL of water/CH₃CN (1:1) was added the peptide **6** (34 mg, 43 μmol). The reaction was stirred for 6 h at 25 °C. Conjugate **14** was isolated after purification by RP-HPLC as a white powder (12 mg, 2.9 μmol, 30%). ESI-MS (M+H)⁺ calc 4162.7, found 4160.3.

15 : N-Hydroxysuccinimidyl palmitic ester

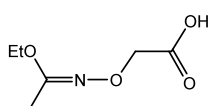


To a stirred solution of palmitic acid (1 g, 3.9 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (0.6 g, 5.2 mmol) in ethyl acetate/dioxane (12 mL, 1:1) at 4 °C was added DCC (0.8 g, 3.9 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in CH₂Cl₂ (80 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ (75 mL), and water (3 x 75 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. NHS ester of palmitic acid **15** was obtained as white powder which was used without further purification (1.2 g, 3.4 mmol, 87 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90 (3H, t, J = 6.7 Hz), 1.28 (22H, m), 1.77 (2H, m), 1.45 (2H, t, J = 7.5 Hz), 2.85 (4H, m).



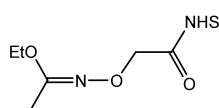
16 : Fmoc-K(CO-(CH₂)₁₄-CH₃)-OH

To a stirred mixture of Fmoc-lysine (0.82 g, 1.7 mmol) and DIEA (0.3 mL, 1.7 mmol) in CH₂Cl₂ (14 mL) at room temperature was added dropwise over 10 min a solution of NHS ester **15** (0.6 g, 1.7 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIEA. After 1 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of CH₂Cl₂ (15 mL), the organic phase was washed with HCl solution (1 M, 2 x 12 mL), water (2 x 12 mL), and brine (12 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated. Lyophilization from water/CH₃CN afforded the building block **16** as a white solid which was used without further purification (0.82 g, 1.4 mmol, 82 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.87 (3H, t, J = 6.7 Hz), 1.24 (22H, m), 1.38-2.5 (10H, m), 2.12 (2H, t, J = 7.7 Hz), 3.08 (2H, m), 3.60 (1H, m), 4.20 (1H, t, J = 7.4 Hz), 4.34 (2H, m), 5.76 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.28 (2H, m), 7.37 (2H, m), 7.59 (2H, m), 7.74 (2H, m).



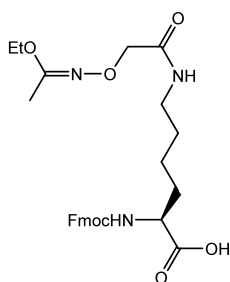
17 : 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetic Acid

To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0 °C was added aqueous NaOH (3.0 mL, 40% w/w). The resulting solution was allowed to heat to room temperature, whereafter ethyl *N*-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40% w/w) and water (19 mL) (pH of solution >12). After 4.5 h of stirring at 80 °C and cooling to room temperature, water was added (70 mL) and the aqueous mixture was washed with CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). The water phase was brought to pH 2-3 with a 1 M HCl solution. The acidified water phase was then extracted with CH₂Cl₂ (4 × 50 mL), and the combined organic phases from this last extraction was washed with brine (50 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated in vacuum, providing compound **17** as a colorless oil (5.69 g, 35.3 mmol, 73%): ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 4.48 (2H, s), 4.00 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.01 (3H, s), 1.27 (3H, t, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 174.5, 165.0, 70.2, 62.8, 14.2, 14.0; DCI-MS (M + H)⁺ calc 162.2, found 162.0.



18 : N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate

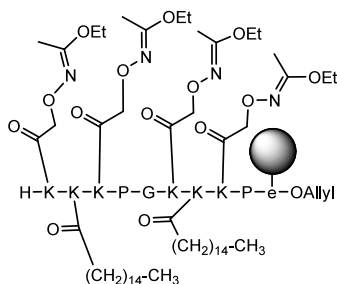
To a stirred solution of compound **17** (5.69 g, 35.3 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (4.06 g, 35.3 mmol) in ethyl acetate/ dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (7.28 g, 35.3 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ (2 × 75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic solution was dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum to oil which was used without further purification (8.69 g, 33.7 mmol, 95%): analytical HPLC tR = 7.6 min; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 4.78 (2H, s), 4.01 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.84 (4H, s), 1.98 (3H, s), 1.28 (3H, t, J = 7.2 Hz).



19 : Fmoc-K(N-Eei-Aoa)-OH

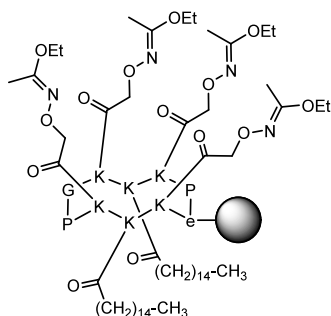
To a stirred mixture of Fmoc-lysine (6.22 g, 16.9 mmol) and DIEA (3.0 mL, 17.3 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) at room temperature was added dropwise over 20 min a solution of the NHS-ester **18** (4.35 g, 16.9 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIEA. After 1 h of reaction, the unreacted Fmoc-lysine was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of CH₃Cl (100 mL), the organic phase was washed with a concentrated citric acid solution. The aqueous phase was then extracted with CH₂Cl₂ (3 × 80 mL). The combined organic phases were then washed with brine (100 mL), dried over Na₂SO₄, and evaporated under reduced pressure. To the residue were added 60 mL of acetonitrile and 60 mL of water. The product was lyophilized, thereby providing the compound **19** as a white powder (7.47 g, 14.6 mmol, 86%): analytical HPLC tR = 10.8 min; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.75 (2H, d, J = 7.4 Hz), 7.60 (2H, d, J = 7.4 Hz), 7.38 (2H, t, J = 7.4 Hz), 7.29 (2H, t, J = 7.4 Hz), 6.50 (1H, t, J = 5.6 Hz), 5.70 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.38-4.36 (5H, m), 4.20 (1H, t, J = 6.9 Hz), 3.96 (2H, q, J = 7.1 Hz), 3.34 (2H, m), 1.96 (3H, s), 1.81 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.45 (2H, m), 1.24 (3H, t, J = 7.1 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 174.7, 171.3, 164.4, 156.2, 143.7, 141.3, 127.7, 127.1, 125.1, 119.9, 72.6, 67.1, 62.8, 53.7, 47.2, 38.5, 31.7, 29.1, 22.1, 14.2, 13.9; ESI-MS (M + H)⁺ calc 512.2, found 512.1.

20 : H-K(N-Eei-Aoa)-K(CO-(CH₂)₁₄-CH₃)-K(N-Eei-Aoa)-P-G-K(N-Eei-Aoa)-K(CO-(CH₂)₁₄-CH₃)-K(N-Eei-Aoa)-P-e(Resin)-OAll

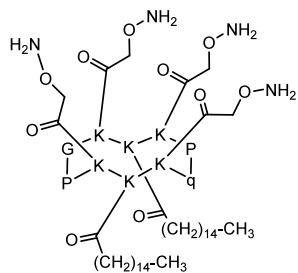


Lipopeptide **20** synthesis was carried out on Rink-amide resin (300 mg, loading 0.2 mmol/g) as described in the general procedure.

21 : c[K(N-Eei-Aoa)-K(CO-(CH₂)₁₄-CH₃)-K(N-Eei-Aoa)-P-G-K(N-Eei-Aoa)-K(CO-(CH₂)₁₄-CH₃)-K(N-Eei-Aoa)-P-e(Resin)]

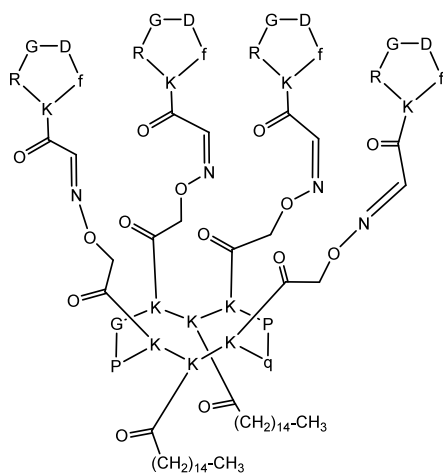


The linear decapeptide **20** on resin (100 mg, 0.02 mmol), previously swelled in dry CH₂Cl₂ under argon (5 mL, 15 min), was treated by adding successively phenylsilane (2.2 mL, 1.3 mmol) followed after 3 min by Pd(PPh₃)₄ (15 mg, 0.013 mmol). The reaction mixtures were stirred for 30 min at room temperature. The resin was washed with CH₂Cl₂ (2 × 10 mL), dioxane/water (9/1, 10 mL), DMF (10 mL) and CH₂Cl₂ (10 mL). Peptide cyclization was performed in DMF (10 mL). pH was adjusted to 8-9 by addition of DIEA, then PyAOP (10 mg, 0.02 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The resin was washed with DMF (5 × 10 mL) and CH₂Cl₂ (10 mL).



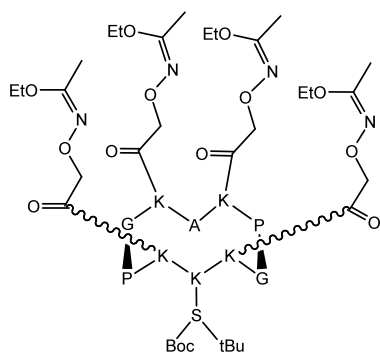
22 : c[K(CO-CH₂ONH₂)-K(CO-(CH₂)₁₄-CH₃)-K(CO-CH₂ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂ONH₂)-K(CO-(CH₂)₁₄-CH₃)-K(CO-CH₂ONH₂)-P-q]

Resin with peptide **21** was treated with a solution of TFA/H₂O/TIS (90/5/5, 10 mL) for 30 min. Solvent was removed under reduced pressure and residue dissolved in the minimum of CH₂Cl₂. Ether was added to precipitate the crude lipopeptide **22**. The latter was triturated and washed three times with diethyl ether affording lipopeptide **22** as a white powder (47.8 mg, 0.019 mmol, 95%). ESI-MS (M+H)⁺ calc 1917.3, found 1912.2.



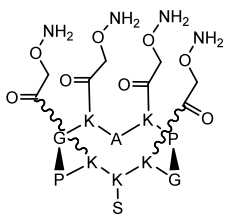
23 : « (palmitic acid)₂-cyclodecapeptide-(RGD)₄ »

To a stirred solution of lipopeptide **22** (10 mg, 4.2 μmol) in acetic acid/H₂O/CH₃CN (50/25/25, 0.5 mL) was added compound **5** (15 mg, 18.5 μmol). After 5 h stirring at room temperature, RP-HPLC purification afforded the compound **23** as a white powder (1 mg, 0.22 μmol, 5%). ESI-MS (M+H)⁺ calc 4485.3, found 4484.6.



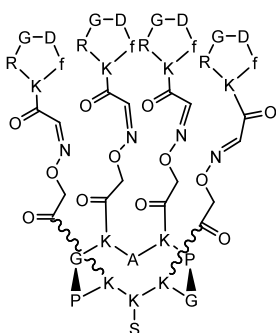
24 : c[-K(N-Eei-Aoa)-K[Boc-S(tBu)]-K(N-Eei-Aoa)-P-G-K(N-Eei-Aoa)-A-K(N-Eei-Aoa)-P-G-]

The linear peptide H-K(N-Eei-Aoa)-K[Boc-Ser(tBu)]-K(N-Eei-Aoa)-P-G-K(N-Eei-Aoa)-A-K(N-Eei-Aoa)-P-G-OH was assembled on Fmoc-G-SASRIN[®] resin (500 mg) using modified amino acid **2** and **19**. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (1:1:8). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide **24** as a white solid powder after precipitation in diethyl ether. This crude material was used without further purification.



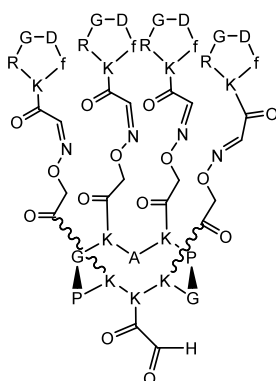
25 : c[K(CO-CH₂ONH₂)-K(S)-K(CO-CH₂ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂ONH₂)-A-K(CO-CH₂ONH₂)-P-G]

Removal of protected moieties from compound **24** was carried out in a solution containing TFA/TIS/H₂O (90/5/5; 10⁻² M) for 2 h at room temperature. The deprotected peptide **24** as a white solid powder after precipitation in ether. This crude material was used without further purification. ESI-MS (M+H)⁺ calc 1399.7, found 1399.7.



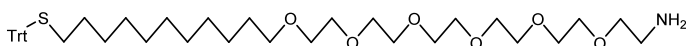
26 : « Ser-cyclodecapeptide-(RGD)₄ »

To a mixture of peptides **25** and **5** (1.1 equiv per sites) were added 2,2 mL (10⁻² M) acetonitrile/water (1:1) at room temperature. The reaction mixture was stirred 2 h. The conjugate peptide **26** as a white solid powder after precipitation in ether. ESI-MS (M+H)⁺ calc 3967.3, found 3966.4.



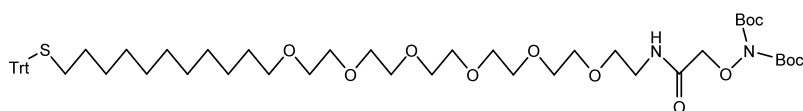
27 : « αceto-aldehyde-cyclodecapeptide-(RGD)₄ »

The deprotected peptide **26** and NaIO₄ (10 eq.) were dissolved in 1 mL of acetonitrile/water (1/1). The mixture was stirred for 20 min and the product was purified by RP-HPLC affording pure aldehyde-containing cyclodeptide **27** as a white powder (21 mg, 25% for 4 steps). ESI-MS (M+H)⁺ calc 3933.9, found 3953.7 (M+H₂O)⁺ and 3974.0 (M+K)⁺.



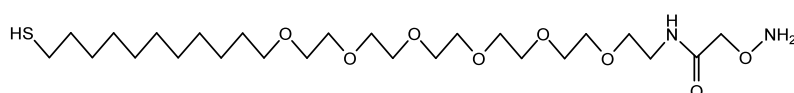
28 : Trt-S-(CH₂)₁₁-(O-CH₂-CH₂)₆-NH₂

To a stirred solution of trityl chloride (107 mg, 0.39 mmol) in CH₂Cl₂ (36 mL) was added trifluoroacetic acid (2 mL) and then the commercial HS-(CH₂)₁₁-(O-CH₂-CH₂)₆-NH₂ (180 mg, 0,39 mmol). The resulted mixture was concentrated two times, with a minimum of CH₂Cl₂, under vacuum providing an incolour oily residue. This crude material was used without further purification. Analytical HPLC tR = 14.4 min. ESI-MS (M+H)⁺ calc 710,4, found 710,4.



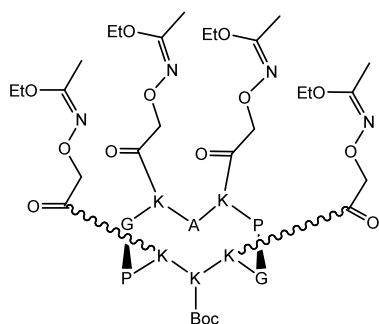
29 : Trt-S-(CH₂)₁₁-(O-CH₂-CH₂)₆-NH-CO-CH₂-O-N(Boc)₂

(Boc)₂NOCH₂-CO-NHS **11** (150 mg, 0,39 mmol) and DIEA were added to a solution of compound **28** (274 mg, 0,39 mmol) in 40 mL of DMF to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 30 min at room temperature and the product was purified by RP-HPLC affording pure product **29** as a white powder. ESI-MS (M+H)⁺ calc 984.3, found 984.3.



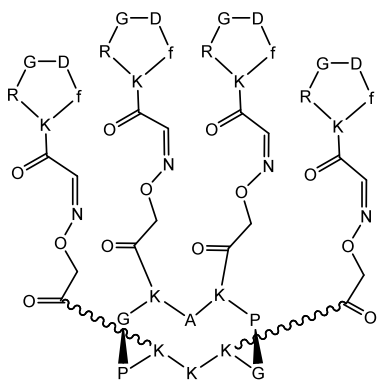
30 : HS-(CH₂)₁₁-(O-CH₂-CH₂)₆-NH-CO-CH₂-O-NH₂

Removal of Boc moieties from compound **29** was carried out in a solution containing TFA/TIS/H₂O (1/1/1) for 30 min at room temperature. The crude product was concentrated and then purified in C₁₈ column eluted with H₂O and acetonitril to afford compound **30** as a white powder. ESI-MS (M+H)⁺ calc 541.3, found 541.3.



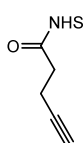
31 : c[-K(N-Eei-Aoa)-K-K(N-Eei-Aoa)-P-G-K(N-Eei-Aoa)-A-K(N-Eei-Aoa)-P-G-]

The linear decapeptide was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (150 mg, loading of 1.1 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **7** and **8**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFE/AcOH/CH₂Cl₂ (2:1:7). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether. The cyclization reaction was carried out using crude linear peptide affording the cyclic peptide as a white solid powder (173 mg, quantitative) after precipitation in diethyl ether. ESI-MS (M+H)⁺ calc 1693.9, found 1693.7.



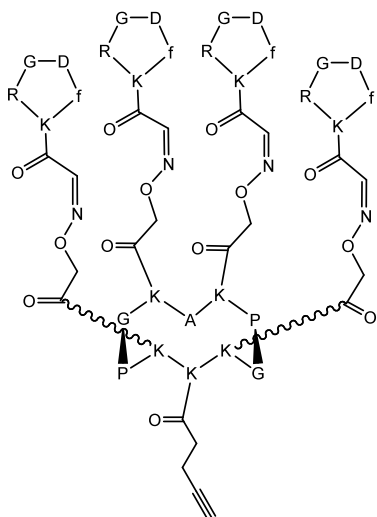
32 : « Cyclodecapeptide-(RGD)₄ »

To a mixture of peptides **31** and **5** (1.5 equiv per sites) were added 500 μL TFA/water (9:1) at room temperature. The reaction mixture was stirred 2 h and the solution was purified by RP-HPLC to give the desired compound **32** as a white powder (10.8 mg, 65 %). ESI-MS $(\text{M}+\text{H})^+$ calc 3877.9, found 3878.0.



33 : 4-Pentynoic acid succinimidyl ester

To a stirred solution of pent-4-ynoic acid (1 g, 10.2 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.18 g, 10.2 mmol) in ethyl acetate/dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (2.10 g, 10.2 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO_3 (2 x 75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated. Recrystallization from CH_2Cl_2 / pentane afforded **33** in 98% yield as white solid which was used without further purification (1.95 g, 10 mmol). ^1H NMR, CDCl_3 : δ 2.03 (1H, t, $J = 2.4$ Hz), 2.60 (2H, td, $J = 2.4, 7.0$ Hz), 2.83 (4H, s), 2.87 (2H, t, $J = 7.0$ Hz); ^{13}C NMR, CDCl_3 : δ 14.1, 25.6, 30.3, 69.6, 80.3, 167.1, 169.0.



34 : « Alcyne-Cyclodecapeptide-(RGD)₄ »

DIEA was added to a solution of peptide **32** (5 mg ; 1,29 μmol) and compound **33** (2 mg ; 10 μmol) in 1 mL of DMF to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 2 h at room temperature and the product was purified by RP-HPLC affording pure product **34** as a white powder (3,7 mg). ESI-MS $(\text{M}+\text{H})^+$ calc 3958.8, found 3959.4.

II. Physico-chimie

1. Solvants et produits

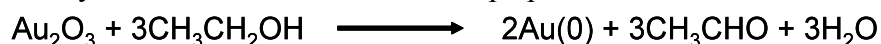
Le PBS (Phosphate Buffer Saline), le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), le serum foetal de veau, la pénicilline et la streptomycine utilisés en culture cellulaire sont obtenus chez la société Gibco. Le thiol-PEG-biotine (2-(2-(2-(2-(2-(2-(1-mercaptopundec-11-yloxy) ethoxy) ethoxy) ethoxy) ethoxy) ethoxy) ethyl biotinamide) est obtenu de la société Prochimia et le thiol-PEG-OH ((1-mercaptopundec-11-yl)tetra(ethylene glycol)) provient de la société Aldrich. L'eau ultrapure est obtenue à partir d'un appareil Milli-Q Purelab UHQ de la société Elga avec une résistivité de 18.2 MΩ/cm. La streptavidine de *streptomyces avidinii* et le Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride) sont obtenus de la société Sigma. Tous les réactifs ont une pureté analytique. Le POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) est obtenu de la société Avanti Polar Lipids. Le ferrocène-méthanol et les sels Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, KPF₆, MnCl₂ et KCl sont obtenus de la société Accros organics, NaCl de la société Fluka, NaOH de la société Laurylab et MgCl₂ de la société Aldrich. Le SDS (sodium dodecyl sulphate) est obtenu de la société Panreac.

Tampon Tris : Tris HCl 50 mM ; NaCl 150 mM ; MgCl₂ 2 mM ; MnCl₂ 1 mM ; pH = 7,4.

Tampon PBS utilisé en QCM : Na₂HPO₄ 0,01 M ; NaCl 0,137 M ; KCl 0,0027 M ; pH = 7,4.

2. Traitements de surfaces d'or

Toutes les surfaces d'or utilisées dans ce travail sont préalablement activées par un traitement à l'UV/ozone au moyen d'un appareil UVO-Cleaner n° 42-220 de chez Jelight Company, Inc puis par un rinçage à l'éthanol. Le traitement par UV-ozone est exécuté dans une chambre d'UV/Ozone dans laquelle une lampe génère de la lumière à des longueurs d'onde spécifiques de 185 nm et de 254 nm. La surface est traitée avec le rayonnement UV de longueur d'onde de la lampe et de la génération de l'ozone par la rupture de la liaison O-O, de l'oxygène atmosphérique, par le rayonnement de longueur d'onde de 185 nm. Les contaminants organiques excités par le rayonnement de 254 nm réagissent avec de l'ozone pour former des produits volatils tels que l'eau et le dioxyde de carbone. Ce traitement conduit à une surface propre légèrement oxydée. L'immersion dans l'éthanol pur a ensuite pour but la réduction de l'oxyde d'or formé au cours de l'étape précédente :



Les surfaces résultant d'un tel traitement sont immédiatement mises en contact avec les solutions d'alcanethiols pour la formation des SAMs.

3. Electrochimie

Les expériences de voltamétrie cyclique sont effectuées avec un appareil CHI-440 de la société CH-Instrument. Le montage électrochimique utilisé est constitué d'une cellule électrochimique à trois électrodes : l'électrode de travail (toutes les expériences d'électrochimie ont été réalisées sur les surfaces d'or des quartz de QCM-D), l'électrode de référence et la contre-électrode. Les potentiels d'électrode sont donnés par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl/KCl (3 M). L'électrode auxiliaire est un fil de platine. Toutes les études électrochimiques sont effectuées à température ambiante. La cellule électrochimique utilisée dans ces études a la même géométrie que la chambre de mesure du

module de QCM-D D300. Avant toute mesure, les différentes solutions aqueuses, sont désoxygénées pendant une vingtaine de minutes par barbotage d'azote.

4. Ellipsométrie

Les expériences en ellipsométrie ont été effectuées sur un appareil EP³-SE de la société Nanofilm Technology GmbH. Les mesures ont été réalisées à une longueur d'onde λ de 630,2 nm à température ambiante et à des angles d'incidence variant entre 50° et 80°.

Les modélisations optiques ont été obtenues en utilisant le logiciel EP3View de la société Nanofilm Technology GmbH. Les propriétés optiques de chacun des quartzs d'or ont été au préalable mesurées. Un modèle « trois couches », substrat/couche organique/air ambiant a été utilisé pour analyser les données.

5. Mesure d'angles de contact

Les mesures d'angle de contact sont effectuées avec un appareil FTA188 Video Tensiometer de la société First Ten Angstroms. Les expériences sont effectuées sur les quartzs recouverts d'or utilisés en QCM-D avec une goutte d'eau d'environ 2 μ L d'eau Ultra Pure.

6. AFM

Les expériences de microscopie à force atomique ont été réalisées en milieu liquide, en mode Taping avec excitation magnétique des leviers (MAC Mode) au moyen d'un appareil Pico Plus de la société Molecular Imaging. Des leviers de type II MAC Levers (force constant = 2,8 N/m) ont été utilisés pour imager les surfaces d'or tandis que des leviers plus souples de type V MAC Levers (force constant = 0,4 N/m) ont été utilisés pour imager les bicouches lipidiques déposées sur wafer de silicium.

7. Autres méthodes

Les clichés de microscopie à transmission électronique des SUV ont été pris en mode cryomicroscopique par Jean-Luc Putaux du CERMAV, à Grenoble.

Les mesures en diffusion de la lumière ont été réalisées sur un appareil Zetasizer Nano series de chez Malvern Instrument au CERMAV, à Grenoble.

8. Culture cellulaire

Les cellules HEK293 β 1 et HEK293 β 3 sont des clones de la lignée cellulaire de rein embryonnaire humain (HEK pour Human Embryonic kidney) transfectée par des plasmides codant respectivement pour les sous-unités des intégrines humaines β 3 et β 1. Elles sont cultivées à 37 °C en atmosphère à 5% de CO₂. Le milieu de culture se compose de DMEM contenant 4,5 g/ml de glucose, du GlutaMAX[®], du pyruvate et du rouge de phénol (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, de 0,5% d'un mélange pénicilline/streptomycine (Gibco) et de 700 μ g/ml de G418 (antibiotique).

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont détachées à l'aide d'une solution de trypsine et les cellules flottantes sont centrifugées à 1200 rpm pendant 5-6 minutes. Elles sont comptées sur une cellule de Malassez en présence de bleu de Trypan (colore les cellules mortes) puis remises en culture à la densité désirée ou mises en suspension dans du DMEM seul sans sérum (100 000 cellules/mL) afin d'être utilisées pour les études d'adhésion cellulaire sur surface.

9. QCM-D

Les expériences de microgravimétrie ont été réalisées sur des appareils Q-Sense modèles D300, E-1 et E-4. Le principe de fonctionnement de l'appareil a été développé dans le chapitre I. Les quartzs d'or (QSX 301 de Q-Sense) et de silice (QSX 303) sont recouverts d'or sur chaque face et d'une couche de SiO₂ de 40 nm d'épaisseur (pour les quartzs de silice).

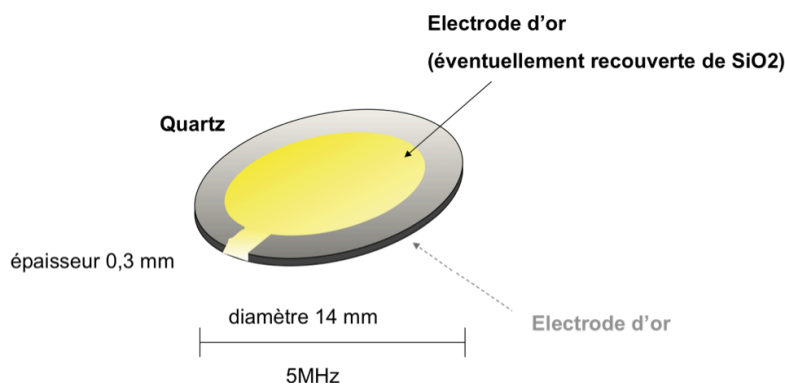


Schéma 41 : Quartz recouvert d'or utilisé en QCM-D.

Le signal d'excitation des quartzs est sinusoïdal, d'une fréquence de 5 MHz. Le suivi de l'amortissement des oscillations après coupure de la source d'excitation est réalisé à cette fréquence fondamentale ainsi qu'aux trois premières harmoniques 15, 25 et 35 MHz (pour les mesures effectués avec le modèle D300) ou les six premières 15, 25, 35, 45, 55 et 65 MHz (pour les modèles E-1 et E-4).

Les solutions injectées dans la chambre de mesure sont, au préalable, maintenues à 37°C avec un thermomixeur Eppendorf.



Schéma 42 : Photo du thermomixeur utilisé pour maintenir les solutions à 37°C et agiter les suspensions cellulaires.

a. Activation des surfaces d'or

Les surfaces d'or sont activées avant chaque greffage selon le protocole suivant :

- rinçage au SDS puis à l'eau, séchage sous flux d'azote
- exposition de 10 minutes à l'UV-ozone
- immersion pendant 15 minutes dans l'éthanol absolu sous agitation, séchage sous flux d'azote

La surface activée est alors immédiatement mise en contact avec les solutions de thiol.

b. Régénération des surfaces d'or

Dans le cas de l'étude d'une couche de biomolécules :

- exposition de 10 minutes à l'UV-ozone
- immersion pendant 1 min dans l'éthanol absolu sous ultra-sons
- immersion pendant 15 minutes dans l'éthanol absolu sous agitation, séchage sous flux d'azote

Dans le cas de l'étude de l'adhésion cellulaire :

- immersion pendant 2 min dans une solution d'Hellmanex à 1% sous ultra-sons
- rinçage à l'eau Milli-Q
- immersion pendant 2 min dans l'éthanol absolu sous ultra-sons
- exposition de 10 minutes à l'UV-ozone
- immersion pendant 15 minutes dans l'éthanol absolu sous agitation, séchage sous flux d'azote

Les surfaces sont ainsi régénérées au maximum 10 fois selon l'un ou l'autre des protocoles.

c. Activation des surfaces de silice

Les surfaces ont été systématiquement nettoyées selon le protocole suivant :

- Rinçage à l'eau milliQ puis séchage sous azote
- Exposition de 10 min à l'UV-Ozone
- Immersion pendant 30 min dans une solution de SDS à 2% sous agitation
- Rinçage à l'eau milliQ et séchage à l'azote

Les surfaces sont ensuite régénérées au maximum 8 fois selon ce cycle d'activation.

d. Mode d'utilisation de la QCM-D

i. Mode « statique » avec le modèle D-300

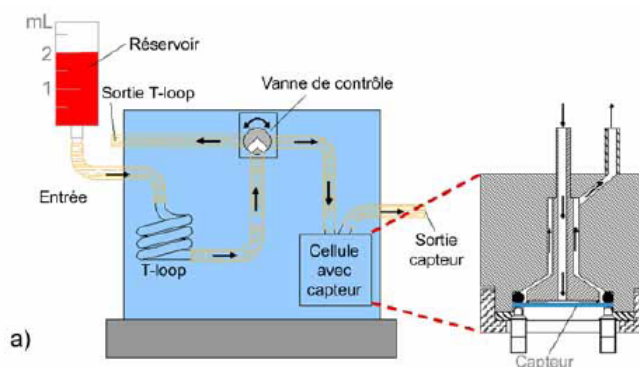


Schéma 43 : Description schématique du mode statique de fonctionnement du modèle D-300. La direction du transport du liquide est indiquée par des flèches.

La QCM-D a été utilisée avec ce mode pour l'étude de la formation de la SAM. Il s'agit de l'utilisation classique du modèle D-300, la chambre de mesure se compose alors d'une boucle (T-loop) qui permet de réguler en température les solutions injectées afin de garantir une stabilité du signal et d'une cellule de mesure où se situe le cristal de quartz. Dans ce mode de mesure, les solutions sont d'abord injectées dans la T-loop (1,5 mL) puis après deux minutes de mise en température, elles sont envoyées (0,5 mL) dans la cellule de mesure grâce

à un système de vanne. Chaque injection dans la chambre de mesure nécessite 2 mL de produit et 0,5 mL pour chaque injection supplémentaire. Ce mode d'utilisation nécessite une grande quantité de produit, ce qui peut devenir un facteur limitant lorsque l'on travaille avec des molécules onéreuses disponible en faible quantité.

ii. Mode « flux continu » avec le modèle E4



Schéma 44 : A gauche, un module utilisé pour le mode flux continu ; Au milieu, les quatre modules installés en parallèle dans le modèle E-4 ; A droite, le modèle de QCM-D en fonctionnement, avec les solutions à injecter d'un côté et la pompe péristaltique de l'autre.

La plupart des études d'adhésion cellulaire ont été effectuées avec ce module à flux. Le liquide est injecté dans la cellule de mesure via l'utilisation d'une pompe péristaltique à douze galets, de chez Ismatec, modèle ISM 597, à l'aval de la cellule de mesure. L'utilisation d'une pompe péristaltique permet de travailler à des débits faibles et constants. Avant d'arriver dans la chambre de mesure, les solutions passent à travers un circuit qui permet de stabiliser la température avant l'injection dans la chambre. Toute la cellule est en fait régulée en température de façon précise ce qui permet d'éviter toute variation des paramètres mesurés due à ce facteur.

iii. Mode « statique » avec le modèle E4



Les cellules de mesure utilisées dans ce cas n'ont pas de fluide mais un couvercle qui permet d'accéder directement à la surface du quartz et de la recouvrir manuellement de la solution d'analyte à l'aide d'une micropipette. 1 mL de solution tampon est d'abord injecté provoquant alors un « pic d'injection » liées aux perturbations mécaniques et aux variations de température induites par l'injection. Après la stabilisation des signaux de fréquence et de dissipation, quelques microlitres de solution concentrée de streptavidine ou de ligand sont

alors ajoutés dans la chambre de mesure pour obtenir la concentration voulue. L'homogénéisation de la solution se fait à partir d'une suite d'aspiration/injection à l'aide de la micropipette. Après stabilisation des signaux, le rinçage s'effectue par une succession de trois aspirations de 800 μL de la solution dans la chambre de mesure et donc de trois injections de tampon seul. Le passage dans le DMEM se fait de la même façon. Après stabilisation des signaux, on ajoute un nombre connu de cellules en suspension dans un petit volume de DMEM dans la chambre de mesure.

e. Protocole se rapportant au couplage affif

Pour l'étude de la construction de la SAM, le quartz recouvert d'or est monté dans la chambre de mesure de la D-300 tout de suite après l'activation. Trois injections successives d'éthanol sont d'abord réalisées à 5 minutes d'intervalle puis on injecte la solution de PEG-OH ou de PEG-biotine à 1 mM dans l'éthanol. L'enregistrement est fait toute la nuit pour visualiser la formation et la réorganisation de la couche. La chambre de mesure est ensuite rincée trois fois à l'éthanol.

Pour l'étude de la construction de la couche de biomolécules et les tests d'adhésion cellulaire, après le protocole d'activation, le quartz recouvert d'or est mis en contact pendant une nuit avec une solution d'alcanethiol (PEG-OH et PEG-biotine à différentes fractions molaires) à 1 mM dans l'éthanol. Après formation de la SAM, le quartz est rincé trois fois avec de l'éthanol, séché sous flux d'argon puis monté dans la chambre de mesure de QCM-D E-4. La chambre de mesure est alors stabilisée à 37°C. Afin d'éviter la formation de bulles sur la surface dans la chambre de mesure, la solution tampon est dégazée sous vide dans un bain à ultrasons pendant une trentaine de minutes. Après injection du tampon PBS à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, on attend la stabilisation du signal pour obtenir la ligne de base. Dans le cas des surfaces présentant des PEG-biotine, on injecte alors une solution de streptavidine à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans le PBS jusqu'à stabilisation des signaux. Après rinçage de la surface avec du tampon PBS pendant 15 min, la molécule **13** (biotine-cyclodécapeptide-(RGD)₄) ou la molécule **14** (biotine-cyclodécapeptide-(RAD)₄) est injectée dans la chambre de mesure à une concentration de 1 μM (pour les surfaces à 10% de PEG-biotine) ou à 0,1 μM (pour les pourcentages inférieurs de PEG-biotine dans la couche) dans le PBS jusqu'à la stabilisation des signaux. La surface est ensuite rincée au tampon PBS pendant 15 minutes.

f. Protocole se rapportant à la formation de bicouche lipidique

Après activation de la surface de silice selon le protocole décrit précédemment, le quartz est monté dans la cellule. La chambre de mesure est alors stabilisée à 37°C. Afin d'éviter la formation de bulles sur la surface dans la chambre de mesure, les solutions tampon sont dégazées sous vide dans un bain à ultrasons pendant une trentaine de minutes. Après injection du tampon Tris à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, on attend la stabilisation du signal pour obtenir la ligne de base. La solution de SUV à 0,2 mg/mL dans le tampon Tris est alors injectée à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans la chambre de mesure jusqu'à stabilisation du signal. Les signaux de fréquence et de dissipation observés pendant cette injection sont caractéristiques de la formation de la bicouche lipidique. La surface est alors rincée à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec du tampon Tris pendant 15 minutes puis avec du tampon PBS pendant au moins 1 h. Le rinçage au tampon PBS permet ensuite d'enchaîner directement avec l'étude de l'adhésion cellulaire.

g. Protocole de formation de la couche de reconnaissance par formation d'un lien triazole

Après le protocole d'activation, le quartz recouvert d'or est mis en contact pendant toute la nuit avec une solution d'alcanethiol (PEG-OH et PEG-N₃ à différentes fractions molaires) à

1 mM dans l'éthanol. Après formation de la SAM, la surface est rincée trois fois avec de l'éthanol et séchée sous flux d'argon. La solution contenant l'alcyne et les réactifs de couplage est alors mise en contact avec la surface à fonctionnaliser. Cette solution contient CuSO_4 20 mM ; TBTA 3 mM ; ascorbate de sodium 35 mM ; ligand **34** 2 mM ; dans $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (2/1). La surface est alors rincée 2x5 min avec H_2O puis 5 min avec CH_2Cl_2 puis 5 min avec EtOH, séchée sous flux d'argon puis montée dans la chambre de mesure de QCM-D E-4. La chambre de mesure est alors stabilisée à 37°C. Afin d'éviter la formation de bulles sur la surface dans la chambre de mesure, la solution tampon est dégazée sous vide dans un bain à ultrasons pendant une trentaine de minutes. Après injection du tampon PBS à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, on attend la stabilisation du signal pour obtenir la ligne de base.

h. Protocole des tests d'adhésion cellulaire

Pendant tous les tests d'adhésion cellulaire, les suspensions cellulaires sont agitées et maintenues à 37°C avec le thermomixeur. Alors que la surface est en contact avec le PBS et que l'on observe une ligne de base stable, on injecte le DMEM dans la chambre de mesure pendant 30 min à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. La suspension cellulaire est alors injectée dans la chambre de mesure à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant environ 1,5 h. La surface est ensuite rincée avec le DMEM à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

10. Microscopie

Les tests de microscopie optique sont réalisés avec un microscope Axio Imager A1m de la société Carl Zeiss et couplés avec la QCM-D grâce à la chambre à fenêtre Q-sense window module 401.

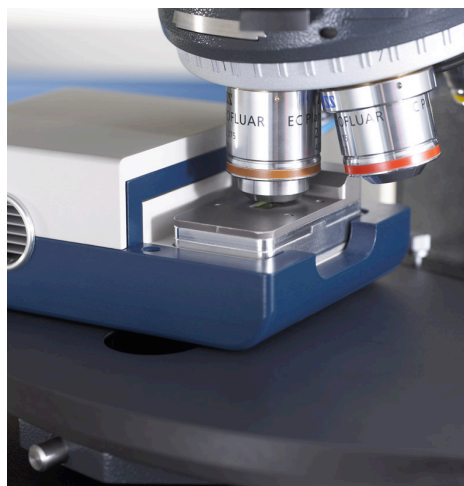


Schéma 45 : A gauche, module de QCM-D à fenêtre transparente permettant de visualiser la surface avec un microscope ; A droite, le modèle E-1 de la QCM-D est monté avec le module à fenêtre transparente sur la plateforme du microscope.

Le microscope est alors utilisé en lumière réfléchiée avec deux types d'objectifs : les objectifs à grossissement x5 ou x10 sont des objectifs classiques alors que l'objectif à grossissement x20 peut être utilisé en contraste interférentiel différentiel.

Les images sont enregistrées et traitées avec le logiciel Axiovision de la société Carl Zeiss. La construction des couches de reconnaissance est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les cellules ne sont injectées sur la surface que pendant 15 min pour éviter la formation d'amas sur la surface et ainsi pouvoir suivre l'étalement de quelques cellules isolées. Un premier film est réalisé en grossissement x50 lors de l'injection

des cellules. Puis l'étude de l'étalement des cellules est réalisée au cours de l'injection du DMEM pendant 1 h avec un grossissement x200.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Mammen, M. ; Choi, S.K. ; Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2774.
2. Gestwicki, J.E. ; Cairo, C.W. ; Strong, L.E. ; Oetjen, K.A. ; Kiessling, L.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
3. Folkman, J. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186.
4. Luo, B.H. ; Springer, T.A. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 579-586.
5. Xiong, J.P. ; Stehle, T. ; Zhang, R. ; Joachimiak, A. ; Frech, M. ; Goodman, S.L. ; Arnaout, M.A. *Science* **2002**, *296*, 151-155.
6. Aumailley, M. ; Gurrath, M. ; Müller, G. ; Calvete, J. ; Timpl, R. ; Kessler, H. *FEBS Letters*, **1991**, *1*, 50-54.
7. Gurrath, M. ; Müller, G. ; Kessler, H. ; Aumailley, M. ; Timpl, R. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-921.
8. Hersel, U ; Dahmen, C. ; Kessler, H. *Biomaterials*, **2003**, *24*, 4385-4415.
9. Goodman, S.L. ; Holzemann, G. ; Sulyok, G.A. ; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045-1051.
10. Lakey, J.H. ; Raggett, E.M. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1998**, *8*, 119-123.
11. Liu, L. ; Chen, S. ; Giachelli, C.M. ; Ratner, B.D. ; Jiang, S. *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, *74A*, 23-31.
12. Dalsin, J.L. ; Messersmith, P.B. *Material Today*, **2005**, *9*, 38-46.
13. Lee, J.H. ; Kopecek, J. ; Andrade, J.D. *J. Biomed. Mater. Res.* **1989**, *23*, 351-368.
14. Jeon, S.I. ; Lee, J.H. ; Andrade, J.D. ; De Gennes, P.G. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149-158.
15. Herrwerth, S. ; Eck, W. ; Reinhardt, S. ; Grunze, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9359-9366.
16. Iwasaki, Y. ; Ishihara, K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 534-546.
17. Hayward, J.A. ; Chapman, D. *Biomaterials* **1984**, *5*, 135-142.
18. Massia, S.P. ; Stark, J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *56*, 390-399.
19. Schuler, M. ; Owen, G.R. ; Hamilton, D.W. ; de Wild, M. ; Textor, M. ; Brunette, D.M. ; Tosatti, S.G.P. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 4003-4015.
20. Guillaume-Gentil, O. ; Akiyama, Y. ; Schuler, M. ; Tang, C. ; Textor, M. ; Yamato, M. ; Okano, T. ; Vörös, J. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 560-565.
21. Thid, D. ; Bally, M. ; Holm, K. ; Chessari, S. ; Tosatti, S. ; Textor, M. ; Gold, J. *Langmuir*, **2007**, *23*, 11693-11704.
22. Chluba, J. ; Voegel, J.-C. ; Decher, G. ; Erbacher, P. ; Schaaf, P. ; Ogier, J. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 800-805.
23. Massia, S.P. ; Hubbell, J.A. *J. Cell. Biol.* **1991**, *114*, 1089-1100.
24. Kalinina, S. ; Gliemann, H. ; Lopez-Garcia, M. ; Petershans, A. ; Auernheimer, J. ; Schimmel, T. ; Bruns, M. ; Schambony, A. ; Kessler, H. ; Wedlich, D. *Biomaterials*, **2008**, *29*, 3004-3013.
25. Brian, A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, *81*, 6159-6163
26. Liebau, M. ; Bendas, G. ; Rothe, U. ; Neubert, R.H.H. *Sensors and Actuators B* **1998**, *47*, 239-245.
27. Loessner, D. ; Kessler, H. ; Thumshirn, G. ; Dahmen, C. ; Wiltschi, B. ; Tanaka, M. ; Knoll, W. ; Sinner, E.K. ; Reuning, U. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4524-4533.
28. Mashaghi, A. ; Swann, M. ; Popplewell, J. ; Textor, M. ; Reimhult, E. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3666-3676.
29. Seantier, B. ; Kasemo, B. *Langmuir* **2009**, *25*, 5767-5772.

30. Sackmann, E. *Science*, **1996**, *271*, 43-48.
31. Svedhem, S. ; Dahlborg, D. ; Ekeröth, J. ; Kelly, J. ; Höök, F. ; Gold, J. *Langmuir* **2003**, *19*, 6730-6736.
32. Reviakine, I.; Brisson, A. *Langmuir* **2001**, *17*, 8293-8299.
33. Richter, R. P.; Brisson, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 1632-1640.
34. Ochsenhirt, S.E. ; Kokkoli, E. ; McCarthy, J.B. ; Tirrell, M. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 3863-3874.
35. Worsfold, O. ; Voelker, N.H. ; Nishiya, T. *Langmuir*, **2006**, *22*, 7078-7083.
36. Thid, D. ; Holm, K. ; Eriksson, P.S. ; Ekeröth, J. ; Kasemo, B. ; Gold, J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2008**, *84A*, 940-953.
37. Berndt, P. ; Fields, G.B. ; Tirrell, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9515-9522.
38. Marchi-Artzner, V. ; Lorz, B. ; Hellerer, U. ; Kantlehner, M. ; Kessler, H. ; Sackmann, E. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1095-1101.
39. Stroumpoulis, D. ; Zhang, H. ; Rubalcava, L. ; Gliem, J. ; Tirell, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 3849-3856.
40. Jensen, T.W. ; Hu, B.-H. ; Delatore, S.M. ; Garcia, A.S. ; Messersmith, P.B. ; Miller, W.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15223-15230.
41. Nuzzo, R.G. ; Allara, D.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481-4483.
42. Bain, C.D., Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7164-7175.
43. Prime, K.L. ; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721.
44. Ostuni, E. ; Yan, L. ; Whitesides, M. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **1999**, *15*, 3-30.
45. Houseman, B.T. ; Mrksich, M. *Biomaterials* **2001**, *22*, 943-955.
46. Choi, S. ; Murphy, W.L. *Langmuir*, **2008**, *24*, 6873-6880.
47. Park, S. ; Yousaf, M.N. *Langmuir*, **2008**, *24*, 6201-6207.
48. Hudalla, G.A. ; Murphy, W.L. *Langmuir*, **2009**, *25*, 5737-5746.
49. Houseman, B.T. ; Gawalt, E.S. ; Mrksich, M. *Langmuir*, **2003**, *19*, 1522-1531.
50. Mrksich, M. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 267-273.
51. Kato, M. ; Mrksich, M. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 2699-2707.
52. Westcott, N.P. ; Pulsipher, A. ; Lamb, B.M. ; Yousaf, M.N. *Langmuir*, **2008**, *24*, 9237-9240.
53. Pulsipher, A. ; Yousaf, M.N. *Langmuir*, **2009**, in press.
54. Chan, E.W.L. ; Yousaf, M.N. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15542-15546.
55. Hendrickson, W.A. ; Pähler, A. Smith, J.L. ; Satow, Y. ; Merritt, E.A. ; Phizackerley, R.P. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1989**, *86*, 2190-2194.
56. Nelson, K.E. ; Gamble, L. ; Jing, L.S. ; Boekl, M.S. ; Naeemi, E. ; Golledge, S.L. ; Sasaki, T. ; Castner, O.G. ; Campbell, C.T. ; Stayton, P.S. *Langmuir* **2001**, *17*, 2807-2816.
57. Perez-Luna, V.H. ; O'Brien, M.J. ; Opperman, K.A. ; Hampton, P.D. ; Lopez, G.P. ; Klumb, L.A. ; Stayton, P.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6469-6478.
58. Shumaker-Parry, J.S. ; Zareie, M.H. ; Aebersold, R. ; Campbell, C.T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 918-929.
59. Su, X. ; Wu, Y.-J. ; Knoll, W. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 719-726.
60. McDevitt, T.C. ; Nelson, K.E. ; Stayton, P.S. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 391-396.
61. Anamelechi, C.C. ; Clermont, E.E. ; Brown, M.A. ; Truskey, G.A. ; Reichert, W.M. *Langmuir*, **2007**, *23*, 12583-12588.
62. Boturyn, D. ; Coll, J.-L. ; Garanger, E. ; Favrot, M.-C. ; Dumy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730-5739.
63. Karp, G. *Biologie cellulaire et moléculaire, Ed. De Boeck*, **2004**.
64. Marx, K.A. ; Zhou, T. ; Warren, M. ; Braunhut, S. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 987-999.

65. Yanase, Y ; Suzuki, H ; Tsutsui, T ; Hiragun, T ; Kameyoshi, Y. ; Hide, M. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1081-1086.
66. Benoit, M. ; Gaub, H.E. *Cells Tissues Organs* **2002**, *172*, 174-189.
67. Simon, A. ; Durrieu, M.-C. *Micron* **2006**, *37*, 1-13.
68. Marcotte, L. ; Tabrizian, M. *ITBM-RBM* **2008**, *29*, 77-88.
69. Ramsden, J.J. ; Li, S.-Y. ; Heinzle, E. ; Prenosil, J.E. *Cytometry* **1995**, *19*, 97-102.
70. Vörös, J. ; Ramsden, J.J. ; Csucs, G. ; Szendro, I. ; De Paul, S.M. ; Textor, M. ; Spencer, N.D. *Biomaterials*, **2002**, *23*, 3699-3710.
71. Gestwicki, J.E. ; Cairo, C.W. ; Mann, D.A. ; Owen, R.M. ; Kiessling, L.L. *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 149-155.
72. Sauerbrey, G. *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206-222.
73. Yang, M. ; Thompson, M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1158-1168.
74. Janshoff, A. ; Galla, H.-J. ; Steinem, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4004-4032.
75. Rodahl, M. ; Kasemo, B. *Sensors and Actuators A* **1996**, *54*, 448-456.
76. Höök, F. ; Kasemo, B. *Springer Ser. Chem. Sens. Biosens.* **2007**, *5*, 425-447.
77. Voinova, M.V. ; Rodahl, M. ; Jonson, M. ; Kasemo, B. *Physica Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
78. Rodahl, M. ; Höök, F. ; Fredriksson, C. ; Keller, C.A. ; Krozer, A. ; Brzezinski, P. ; Voinova, M. ; Kasemo, B. *Faraday Discuss.* **1997**, *107*, 229-246.
79. Redepenning, J. ; Schlesinger, T.K. ; Mechalke, E.J. ; Puleo, D.A. ; Bizios, R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3378-3381.
80. Fredriksson, C. ; Kihlman, S. ; Rodahl, M. ; Kasemo, B. *Langmuir*, **1998**, *14*, 248-251.
81. Nivens, D.E. ; Chambers, J.Q. ; Anderson, T.R. ; White, D.C. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 85-89.
82. Gryte, D.M. ; Ward, M.D. ; Hu W.-S. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9*, 105-108.
83. Heitmann, V. ; Reiss, B. ; Wegener, J. *Springer Ser. Chem. Sens. Biosens.* **2007**, *5*, 303-338.
84. Modin, C ; Stranne, A.-L. ; Foss, M. ; Duch, M. ; Justesen, J. ; Chevallier, J. ; Andersen, L.K. ; Hemmersam, A.G. ; Pedersen, F.S., Besenbacher, F. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 1346-1354.
85. Fredriksson, C. ; Kihlman, S. ; Kasemo, B. ; Steel, D.M. *J. Mat. Sciences : Materials in Medicine* **1998**, *9*, 785-788.
86. Wegener, J. ; Janshoff, A. ; Galla, H.-J. *Eur. Biophys. J.* **1998**, *28*, 26-37.
87. Zhou, T. ; Marx, K.A. ; Warren, M. ; Schulze, H. ; Braunhut, S.J. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 268-277.
88. Dumy, P. ; Eggleston, I.M. ; Cervigni, S. ; Sila, U. ; Sun, X. ; Mutter, M.A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255-1258.
89. Mutter, M. ; Altmann, K.H. ; Tuchscherer, G. ; Vuilleumier, S. *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 771-785.
90. Dulery, V. ; Uhlich, N.A. ; Maillard, N. ; Fluxa, V.S. ; Garcia, J. ; Dumy, P. ; Renaudet, O. ; Raymond, J.L. ; Darbre, T. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4134-4141.
91. Wilczewski, M. ; Van der Heyden, A. ; Renaudet, O. ; Dumy, P. ; Coche-Guérente, L. ; Labbé, P. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1114-1122.
92. Murat, P. ; Cressend, D. ; Spinelli, N. ; Van der Heyden, A. ; Labbé, P. ; Dumy, P. ; Defrancq, E. *Chem. Bio. Chem.* **2008**, *9*, 2588-2591.
93. Dolphin, G.T. ; Chierici, S. ; Ouberai, M. ; Dumy, P. ; Garcia, J. *Chem. Bio. Chem.* **2008**, *9*, 952-963.
94. Boturyn, D. ; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787-2790.
95. Boturyn, D. ; Defrancq, E. ; Dolphin, G.T. ; Garcia, J. ; Labbé, P. ; Renaudet, O. ; Dumy, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 224-240.

96. Garanger, E. *Thèse de l'Université Joseph Fourier*, **2005**, Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie.
97. Foillard, S. *Thèse de l'Université Joseph Fourier*, **2008**, Synthèse de nouveaux vecteurs peptidiques pour la thérapie anti-cancéreuse et l'imagerie tumorale.
98. Garanger, E. ; Boturyn, D. ; Coll, J.L. ; Favrot, M.C. ; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1958-1965.
99. Garanger, E. ; Boturyn, D. ; Jin, Z. ; Dumy, P. ; Favrot, M.C. ; Coll, J.L. *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 1168-1175.
100. Razkin, J. ; Josserand, V. ; Jin, Z.H. ; Dumy, P. ; Favrot, M.C. ; Coll, J.L. ; Texier, I. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.
101. Foillard, S. ; Jin, Z. ; Garanger, E. ; Boturyn, D. ; Favrot, M.-C. ; Coll, J.-L. ; Dumy, P. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2326-2332.
102. Foillard, S. ; Sancey, L. ; Coll, J.L. ; Boturyn, D. ; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 221-224.
103. Foillard, S. ; Dumy, P. ; Boturyn, D. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4159-4162.
104. Wilczewski, M. *Thèse de l'Université Joseph Fourier*, **2007**, Les interactions multivalentes : leurs rôles dans les processus de reconnaissance biomoléculaire et leur application dans la construction d'assemblage supramoléculaire.
105. Devillers, C. *Thèse de l'Université Joseph Fourier*, **2006**, Récepteurs et matériaux redox-actifs pour l'activation et la signalisation d'interactions moléculaires.
106. Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.
107. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
108. Su, X. ; Wu, Y.J. ; Robelek, R. ; Knoll, W. *Langmuir* **2005**, *21*, 348-353.
109. Pfaff, M. ; Tangemann, K. ; Müller, B. ; Gurath, M. ; Müller, G. ; Kessler, H. ; Timpl, R. ; Engel, J. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233-20238.
110. Haubner, R. ; Finsinger, D. ; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1374-1389.
111. Melnyk, O. ; Fehrentz, J.A. ; Martinez, J. ; Gras-Masse, H. *Biopoly.* **2000**, *55*, 165-186.
112. Scott, W.L. ; Martynow, J.G. ; Huffman, J.C. ; O'Donnell, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7077-7088.
113. Gaertner, H. F. ; Rose, K. ; Cotton, R. ; Timms, D. ; Camble, R. ; Offord, R. E. *Bioconjug Chem* **1992**, *3*, 262-268.
114. Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.
115. Brask, J. ; Jensen, K.J. *J. Peptide Sci.* **2000**, *6*, 290-299.
116. Foillard, S. ; Ohsten Rasmussen, M. ; Razkin, J. ; Boturyn, D. ; Dumy, P. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.
117. Wilchek, M. ; Bayer, E.A. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 1-4.
118. Nuzzo, R.G. ; Whitesides, G. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.
119. Chen, S. ; Li, L. ; Boozer, C.L. ; Jiang, S. *Langmuir* **2000**, *16*, 9287-9293.
120. Jung, L.S. ; Nelson, K.E. ; Stayton, P.S. ; Campbell, C.T. *Langmuir* **2000**, *16*, 9421-9432.
121. Mokrani, C. ; Fatisson, J. ; Guérente, L. ; Labbé, P. *Langmuir* **2005**, *21*, 4400-4409.
122. Love, J.C. ; Estroff, L.A. ; Kriebel, J.K. ; Nuzzo, R.G. ; Whitesides, G.M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.
123. Walczak, M.M. ; Popenoe, D.D. ; Deinhammer, R.S. ; Lamp, B.D. ; Chung, C. ; Porter, M.D. *Langmuir* **1991**, *7*, 2687-2693.
124. Widrig, C.A. ; Chung, C. ; Porter, M.D. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *310*, 335-359.
125. Kawaguchi, T. ; Yasuda, H. ; Shimazu, K. ; Porter, M.D. *Langmuir* **2000**, *16*, 9830-9840.

126. Finklea, H. O. *Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances*; Bard, A.J. and Rubinstein, I., Eds.; Marcel Dekker: New York, **1996**, *19*, 109-335.
127. Zheng, J. ; Li, L. ; Chen, S. ; Jiang, S. *Langmuir*, **2004**, *20*, 8931-8938.
128. Rowe, G.K. ; Creager, S.E. *Langmuir*, **1991**, *7*, 2307-2312.
129. Creager, S.E. ; Hockett, L.A. ; Rowe, G.K. *Langmuir*, **1992**, *8*, 854-861.
130. Valiokas, R. ; Östblom, M. ; Björefors, F ; Liedberg, B. ; Shi, J. ; Konradsson, P. *Biointerphases*, **2006**, *1*, 22-34.
131. Amatore, C.; Savéant, J. M.; Tessier, D. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *147*, 39-51.
132. Bard, A.J. et Faulkner, L.R. "Electrochimie. Principes, méthodes et applications", Masson, Paris, 1983.
133. Valiokas, R. ; Svedhem, S. ; Svensson, S.C.T. ; Liedberg, B. *Langmuir*, **1999**, *15*, 3390-3394.
134. Valiokas, R. ; Svedhem, S. ; Östblom, M. ; Svensson, S.C.T. ; Liedberg, B. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5459-5469.
135. Harder, P. ; Grunze, M. ; Whitesides, G.M. ; Laibnis, P.E. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426-436.
136. Williams, L.M. ; Evans, S.D. ; Flynn, T.M. ; Marsh, A. ; Knowles, P.F. ; Bushby, R.J. ; Boden, N. *Langmuir*, **1997**, *13*, 751-757.
137. Spinke, J. ; Liley, M. ; Schmitt, F.-J. ; Guder, H.-J. ; Angermaier, L. ; Knoll, W. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 7012-7019.
138. Heitmann, V. ; Wegener, J. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3392-3400.
139. Lord, M.S. ; Modin, C. ; Foss, M. ; Duch, M. ; Simmons, A. ; Pedersen, F.S. ; Milthorpe, B.K. ; Besenbacher, F. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4529-4537.
140. Kanazawa, K.K. ; Gordon, J.G. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1771-1772.
141. Marx, K.A. *Springer Ser. Chem. Sens. Biosens.* **2007**, *5*, 371-424.
142. Roberts, C. ; Chen, C.S. ; Mrksich, M. ; Martichonok, V. ; Ingber, D.E. ; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6548-6555.
143. Cavalcanti-Adam, E.A. ; Micoulet, A. ; Blümmel, J. ; Auernheimer, J. ; Kessler, H. ; Spatz, J.P. *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 219-224.
144. Cavalcanti-Adam, E.A. ; Volberg, T. ; Micoulet, A. ; Kessler, H. ; Geiger, B. ; Spatz, J.P. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2964-2974.
145. Maheshwari, G. ; Brown, G. ; Lauffenburger, D.A. ; Wells, A. ; Griffith, L.G. *J. Cell Science* **2000**, *113*, 1677-1686.
146. Richter, R.P. ; Brisson, A. ; *Langmuir* **2004**, *20*, 4609-4613.
147. Richter, R.P. ; Maury, N. ; Brisson, A. *Langmuir* **2005**, *21*, 299-304.
148. Keller, C.A. ; Kasemo, B. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1397-1402.
149. Keller, C.A. ; Glasmästar, K. ; Zhdanov, V.P. ; Kasemo, B. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 5443-5446.
150. Richter, R. ; Mukhopadhyay, Brisson, A. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3035-3047.
151. Johnson, S.J. ; Bayerl, T.M. ; McDermott, D.C. ; Adam, G.W. ; Rennie, A.R. ; Thomas, R.K. ; Sackmann, E. *Biophys. J.* **1991**, *59*, 289-294.
152. Reimhult, E. ; Höök, F. ; Kasemo, B. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 7401-7404.
153. Purrucker, O. ; Gönnenwein, S. ; Förting, A. ; Jordan, R. ; Rusp, M. ; Bärmann, M. ; Moroder, L. ; Sackmann, E. ; Tanaka, M. *Soft Matter* **2007**, *3*, 333-336.
154. Nagle, J.F. ; Tristram-Nagle, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1469*, 159-195.
155. Huang, J. ; Gräter, S.V. ; Corbellini, F. ; Rinck, S. ; Bock, E. ; Kemkemer, R. ; Kessler, H. ; Ding, J. ; Spatz, J.P. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1111-1116.
156. H. Basit, *Thèse de l'Université Joseph Fourier, en cours.*
157. Groves, J.T. ; Mahal, L.K. ; Bertozzi, C.R. *Langmuir* **2001**, *17*, 5129-5133.
158. Bresalski, M.A. ; Knaebel, A. ; Tu, R. ; Tirrell, M. *Biomaterials* **2006**, *27*, 1259-1269.

159. Chan, E.W.L. ; Yu, L. *Langmuir* **2002**, *18*, 311-313.
160. Collman, J.P. ; Devaraj, N.K. ; Eberspacher, T.P.A. ; Chidsey, C.E.D. *Langmuir* **2006**, *22*, 2457-2664.
161. Devaraj, N.K. ; Miller, G.P. ; Ebina, W. ; Kakaradov, B. ; Collman, J.P. ; Kool, E.T. ; Chidsey, C.E.D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8600-8601.
162. Dubacheva, G. ; Coche-Guérente, L. ; Auzely, R. ; Labbé, P. *En préparation*.
163. Kolb, H.C. ; Finn, M.G. ; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
164. Rostovtsev, V.V. ; Green, L.G. ; Fokin, V.V. ; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
165. Huisgens, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *75*, 604-637.
166. Tornøe, C.W. ; Christensen, C. ; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
167. Chidsey, C.E.D. ; Bertozzi, C.R. ; Putvinski, T.M. ; Mujsce, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4301-4306.

Résumé

Titre : Caractérisation des interactions biomoléculaires entre des ligands peptidiques immobilisés sur une surface de transducteur et des récepteurs cellulaires

L'objectif visé dans cette étude consiste à développer une méthodologie de caractérisation des interactions ligands/récepteurs cellulaires à la surface d'un transducteur physique. Le ligand immobilisé est représenté par un cyclopentapeptide c(-RGDfK-) dont les propriétés de reconnaissance spécifique pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ sont bien connues. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit concernent la synthèse des ligands peptidiques, la mise au point des différentes techniques d'immobilisation de ces ligands et enfin la caractérisation des interactions biomoléculaires avec des cellules exprimant l'intégrine. Le ligand peptidique est présenté de façon multivalente sur un châssis moléculaire cyclodécapeptidique de séquence c(-Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-)₂. Le greffage des différents motifs se fait *via* la formation d'un lien éther d'oxime ou d'un lien amide sur les chaînes latérales des lysines orientées de part et d'autre du plan moyen du cyclopeptide. Trois approches ont été mises en œuvre pour fixer les ligands -RGD- sur une surface : le couplage affiné, l'insertion dans une bicouche lipidique et le couplage covalent. Les surfaces fonctionnelles résultantes ont été caractérisées par des méthodes physico-chimiques d'analyse de surface et d'interface. Des tests d'adhésion cellulaire, suivis par QCM-D et par microscopie optique, ont ensuite permis de caractériser les propriétés de reconnaissance des ligands peptidiques. La comparaison des signaux de QCM-D et des images de la surface, obtenus à différents taux de greffage du ligand a permis d'identifier une densité de greffage minimale en ligand nécessaire à l'adhésion et à l'étalement des cellules

Mots clés : -RGD- ; QCM-D ; Adhésion cellulaire ; Fonctionnalisation de surface ; Monocouches auto-assemblées ; Bicouche lipidique

Abstract

Title : Characterisation of biomolecular interaction between peptide ligands immobilized on transducer surface and cellular receptors

The aim of this study is to develop a methodology for characterizing ligand/cellular receptor interaction through the immobilization of the ligand on the surface of a physical transducer. The recognition element is based on a cyclopentapeptide c(-RGDfK-) whose specific recognition properties for the $\alpha_V\beta_3$ integrin are well known. Herein, we described the synthesis of peptide ligands, the different techniques of ligand immobilization, and finally the characterization of the biomolecular interactions with cells that express the integrin. A cyclic decapeptide sequence c(-Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-)₂ is used as a scaffold for the multivalent presentation of peptide ligands. Grafting of the different elements was carried out by way of oxime or amide bond at the lysine side chains on each side of the cyclopeptide. Three approaches were used to graft -RGD- ligands on a surface: a binding by the use of biotin-streptavidin interaction, inclusion of a lipopeptide ligand into a lipid bilayer, and through a covalent coupling. The resulting functional surfaces were characterized by physicochemical analysis of surface and interface. Cell adhesion experiments were conducted by using QCM-D and optical microscopy in order to characterize the recognition properties of peptide ligands. The comparison of the QCM-D signals and surface images obtain for different ligand grafted densities on the surface permit to estimate the minimum ligand concentrations required for cell attachment and cell spreading.

Key words : -RGD- ; QCM-D ; Cell adhesion ; Surface functionalization ; Self Assembled Monolayer ; Lipid bilayer